

**AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR CHIRURGIE
(DIREKTOR: PROF. DR. HANS J. SCHLITT)**

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**GENTHERAPEUTISCHER EINSATZ VON ADENO-ASSOZIIERTEN
VIREN ZUR VERBESSERUNG DES TRANSPLANTATÜBERLEBENS NACH
HERZTRANSPLANTATION BEI RATTEN**



**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Cristina Häring

2009

**AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR CHIRURGIE
(DIREKTOR: PROF. DR. HANS J. SCHLITT)**

**DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**GENTHERAPEUTISCHER EINSATZ VON ADENO-ASSOZIIERTEN VIREN ZUR
VERBESSERUNG DES TRANSPLANTATÜBERLEBENS NACH
HERZTRANSPLANTATION BEI RATTEN**



**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Cristina Häring

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Hans-Jürgen Schlitt

2. Berichterstatter

PD Dr. Stephan Hirt

Tag der mündlichen Prüfung:

7.Juli 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 7
1.1 Transplantation	Seite 7
1.2 Gentherapie bei Transplantation	Seite 8
1.3 Ansätze der Gentherapie	Seite 9
1.4 Methoden der Gentherapie	Seite 11
1.4.1 Non-virale Vektoren	Seite 13
1.4.2 Virale Vektoren	Seite 15
1.5 Adeno-assoziierte Viren	Seite 18
1.6 Einschleusung von IDO, CTLA4Ig und IL-10	Seite 23
2. Material und Methoden	Seite 25
2.1 Plasmidproduktion	Seite 25
2.1.1 Transformation	Seite 25
2.1.2 Kultivierung und Extraktion	Seite 25
2.2 Virusherstellung	Seite 26
2.2.1 Zellkultur	Seite 26
2.2.2 Transfektion	Seite 27
2.2.3 Virusisolation	Seite 28
2.3 Tiere und chirurgische Maßnahmen	Seite 31
2.4 Histologie, Immunhistochemie und ELISA	Seite 32
2.5 Analyse der Organarteriosklerose	Seite 33
2.6 Anti-Donor-Antikörper	Seite 34
2.7 RNase protection assay und quantitative real-time PCR	Seite 34
2.8 Statistische Analysen	Seite 35
2.9 Materialien	Seite 36
2.9.1 Reagenzien	Seite 36
2.9.2 Material	Seite 37
2.9.3 Kits	Seite 37
2.9.4 Antikörper	Seite 38
2.9.5 Geräte	Seite 38
2.9.6 Tiere und Zellen	Seite 38

3. Ergebnisse	Seite 39
3.1 Ernten der Zellen nach Transfektion	Seite 39
3.2 Endprodukt der Virusisolation	Seite 40
3.3 Expression der Targetgene	Seite 40
3.4 Effekt von IDO	Seite 44
3.5 Keine signifikante Besserung durch CTLA4Ig	Seite 46
3.6 Verbesserung des Langzeitüberlebens durch IL-10	Seite 47
3.7 Histomorphologische Untersuchungen	Seite 48
3.8 TGF- β 1 und MIF	Seite 53
4. Diskussion	Seite 57
5. Zusammenfassung	Seite 65
6. Abkürzungen	Seite 67
7. Literaturverzeichnis	Seite 69
8. Danksagung	Seite 74
9. Lebenslauf	Seite 75

1. Einleitung

1.1 Transplantation

Seit der ersten erfolgreichen Nierentransplantation in Deutschland im Jahre 1963 nimmt die Zahl der jährlich transplantierten Organe stetig zu. Laut einer Veröffentlichung der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) wurden 2007 in Deutschland rund 4900 Organtransplantationen durchgeführt. Der Großteil der hierfür verwendeten Organe stammt dabei aus postmortalen Spenden. Die Nierentransplantation ist nach wie vor die am häufigsten durchgeführte Organtransplantation, jedoch gewinnt auch die Übertragung von Leber oder Herz immer mehr an Bedeutung. Trotz des stetigen Zuwachses an erfolgreichen Operationen warten weiterhin etwa 12000 Patienten auf lebenswichtige Organe. Misserfolge von Transplantationen sind immer noch hauptsächlich durch Funktionsverluste aufgrund akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen bedingt. Insbesondere die chronische Abstoßungsreaktion kann über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren zu einem therapeutisch kaum mehr beeinflussbaren Verlust des Organs führen und stellt eine der häufigsten Ursachen für Organversagen dar. Das Hauptmerkmal dieser chronischen Reaktion ist die so genannte Transplantatvaskulopathie. Bei Herztransplantaten wird sie als „cardiac allograft vasculopathy“ (CAV) bezeichnet. Hierbei kommt es unter anderem zu einer rasch fortschreitenden Proliferation der Intima in den Gefäßsystemen der transplantierten Organe. Diese führt durch die Entstehung von Stenosen häufig zu kardialen Ischämien bzw. Infarkten und so zu einem daraus resultierenden Organversagen. Die Ätiologie der Transplantatvaskulopathie ist bislang nicht vollständig geklärt,

jedoch konnten in den letzten Jahren zahlreiche immunologische sowie nicht-immunologische Risikofaktoren gefunden werden. Neben nicht-immunologischen Faktoren werden auch nicht identische HLA-Merkmale von Empfänger und Spender sowie die zelluläre Immunabwehr für die schnell proliferierende Gefäßerkrankung verantwortlich gemacht. Da Herztransplantierte Patienten häufig keine typischen pektanginösen Beschwerden zeigen, manifestiert sich eine Abstoßungsreaktion erst spät in Form von Arrhythmien, Herzinsuffizienz oder gar dem plötzlichen Herztod (1). Zur Unterdrückung der körpereigenen Immunreaktion gegen das als fremd erkannte Organ ist eine lebenslange immunsuppressive Therapie unumgänglich. Jedoch sind die hierfür verwandten Medikamente mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen assoziiert, wie z.B. einer gesteigerten Infektanfälligkeit und einer erhöhten Inzidenz maligner Neoplasien. Selbst bei guter Compliance des Patienten lässt sich ein Verlust des transplantierten Organs aufgrund einer chronischen Abstoßung häufig nicht verhindern.

1.2 Gentherapie bei Transplantation

Obwohl sich die Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten vor allem auf dem Gebiet der Operationstechnik und der Behandlung von akuten Abstoßungsreaktionen deutlich weiter entwickelt hat, ist eine erfolgreiche Transplantation nach wie vor mit Komplikationen behaftet:

Prinzipiell stellt die Phase der Ischämie und anschließenden Reperfusion, welcher das Transplantat im Zeitraum zwischen Explantation und Implantation während der Operation ausgesetzt ist, ein großes Risiko für Organverluste dar. Hierbei kann es zu schweren, mitunter irreversiblen Schädigungen des Organs kommen, die eine

mögliche chronische Abstoßungsreaktion begünstigen. Darüber hinaus besteht aufgrund niedriger Spenderbereitschaft der Bevölkerung und limitierender HLA-Kompatibilität ein Mangel an passenden Spenderorganen, was die Therapieoptionen der Transplantation weiter einschränkt.

Seit einigen Jahren bestehen durch das Prinzip der Gentherapie neue Ansätze zur Lösung der genannten Komplikationen in der Transplantationsmedizin.

Durch die Technik der Gentherapie besteht die Möglichkeit, immunmodulatorische Gene gezielt in körpereigene Zellen einzuschleusen, bestimmte Gene vermehrt zu exprimieren oder in ihrer Bildung zu hemmen. Auf diesem Wege soll eine Regulierung der körpereigenen Immunantwort erlangt werden können. Zum Beispiel soll durch die Einschleusung zytoprotektiver Proteine ein transplantiertes Organ vor Schäden bewahrt werden. Hierzu kommen neben speziellen Überträgersystemen, sog. Vektoren auch einfache chemisch-physikalische Methoden zum Einsatz (2).

1.3 Ansätze der Gentherapie

Ein Hauptziel der Gentherapie in der Transplantationsmedizin stellt die Vermeidung sowohl akuter als auch chronischer Abstoßungsreaktionen dar. Als optimal hierfür wird eine einerseits effiziente und andererseits nur lokal wirksame Immunsuppression angesehen. Die Risiken einer systemischen Wirkung sollen auf diese Weise minimiert werden. Als geeignete Ansatzmöglichkeit kommen die T-Zellen des Immunsystems in Frage, die das neue Organ als fremd erkennen und über unterschiedliche Signalwege die Abstoßungsreaktion begünstigen. Dabei werden zunächst MHC-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert, welche von den Immunzellen erkannt werden. Erst durch die zusätzliche

Aktivierung eines sog. kostimulierenden Signalweges, welcher durch Stimulation bestimmter Rezeptoren an T-Zellen und APCs ausgelöst wird, kommt es zu einer vollständigen Aktivierung des T-Zell-Systems. Diese kostimulierenden Signale entstehen durch die Bindung von B7 auf den APCs mit den CD28-Rezeptoren der T-Zellen oder von CD40L auf den APCs mit den CD40-Rezeptoren der T-Zellen. Als Reaktion kommt es unter anderem zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen, B-Zellen und Makrophagen sowie zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Durch Blockierung des kostimulierenden Signalweges zum Beispiel durch das Bindungsprotein CTLA4Ig, welches mithilfe von Vektoren leicht in den Organismus eingebracht werden kann, ist es möglich, eine vollständige Aktivierung der T-Zellen zu hemmen. Auf diesem Weg soll eine Akzeptanz des transplantierten Organs und ein Ausbleiben der Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem erreicht werden.

Ebenso spielen verschiedene Zytokine eine Rolle bei der Immunreaktion auf ein Transplantat. Sie werden in Typ1-Zytokine (z.B. IL-2, Interferon γ), welche von Th1-Helferzellen gebildet werden und Typ2-Zytokine (IL-4 und IL-10), die von Th2-Helferzellen sezerniert werden, unterteilt. Während Typ1-Zytokine Immunreaktionen aktivieren, kommt es bei Sezernierung von Typ2-Zytokinen zu einer Hemmung der Immunantwort. Durch Einschleusung anti-inflammatorischer Typ2-Zytokine, wie z.B. IL-10, soll die körpereigene Immunreaktion auf das fremde Organ reduziert und somit einer Abstoßungsreaktion entgegenwirkt werden.

Neben den immunologischen Ursachen für Organverluste gibt es auch nicht-immunologische Faktoren, die zu einer Schädigung transplanterter Organe führen. Vor einer Transplantation ist das Spenderorgan einer Ischämie-Phase ausgesetzt. Im Anschluss kann es im Rahmen der Reperfusion zu einer Schädigung der Zellen mit

daraus resultierendem Organversagen kommen. Um dieses Risiko zu vermindern, könnten zytoprotektive Proteine eingeschleust werden, die zum Schutz des Gewebes beitragen. Die entsprechenden Gene müssten dabei direkt in die Zielzellen eingeschleust werden. Ein Gentransfer von Hämoxxygenase-1 (HO-1) mittels Adeno-assoziiierter Viren erscheint hierfür möglicherweise erfolgversprechend (3). Dieses oxidative Enzym besitzt aufgrund der Wirkung seiner Abbauprodukte Carbonmonoxid, Biliverdin/Bilirubin und freiem Eisen eine zytoprotektive Eigenschaft (4). Eine stabile Expression von HO-1 in den Zellen des Organtransplantats könnte somit nicht nur zum Schutz vor Schäden durch Ischämie bzw. anschließende Reperfusion beitragen, sondern auch dem Zellumbau entgegenwirken, der eine Arteriosklerose begünstigt (5).

Die wesentlichen therapeutischen Vorteile des Einsatzes von Gentherapie bei der Organtransplantation bestehen zum einen aus der lokalen Immunsuppression unter Umgehung einer lebenslangen systemischen Behandlung, die mit schwerwiegenden Nebenwirkungen assoziiert ist. Zum anderen können die Organe schon vor ihrer Implantation ex vivo mittels Gentransfer behandelt werden, was die Rahmenbedingungen der Transplantation sowohl intra- als auch postoperativ verbessern würde (6, 7).

1.4 Methoden der Gentherapie

Um die Expression erwünschter Proteine zu fördern oder die Produktion fehlerhafter Proteine zu hemmen, kommen unterschiedliche Verfahrensweisen in Frage, durch

die bestimmte Gene auf molekularbiologischem Wege gezielt in einzelne Körperzellen bzw. Gewebe eingebracht werden können.

Der Einschleusungsvorgang stellt einen essentiellen Schritt der erfolgreichen Gentherapie dar und erfolgt über sogenannte Vektoren. Dies sind Überträgersysteme, welche mit der gewünschten DNA versehen sind und diese zur Zielzelle transportieren. Als Vektoren werden für gewöhnlich Viren verwendet, jedoch können auch non-virale Vektoren wie Liposomen oder „nackte“ DNA für den Gentransfer in die Zellen genutzt werden.

Die Überträgersysteme müssen wichtige Kriterien erfüllen: Der Transfer in die Zielzelle muss sowohl effektiv als auch selektiv erfolgen. Weiterhin sind eine geringe Toxizität und eine möglichst lang anhaltende Expression von Bedeutung (8, 9).

Als wichtige Grundvoraussetzung zählt die einfache Produktion des Vektors in großen Mengen, da für die Anwendung beim Menschen unter Umständen eine sehr hohe Anzahl an Zellen infiziert werden müssen. Desweiteren muss eine ausreichend lange und leicht regulierbare Expression des gewünschten Genes gewährleistet sein. Dies ist nicht nur für die lebenslange Immunsuppression nach Organtransplantation wichtig, sondern kommt zum Beispiel auch bei der Behandlung der Hämophilie zum Tragen, bei der ein genetisch bedingter Mangel an Faktor IX vorliegt. Es bestehen gentherapeutische Ansätze, durch die dieser Mangel behoben werden soll, um so eine lebenslange Regulierung der Koagulation zu gewährleisten (10).

Damit ein Transfer mittels viralem Vektor funktionieren kann, darf dieser nicht durch das körpereigene Immunsystem frühzeitig aus dem Organismus eliminiert werden. Deshalb muss eine überschießende Immunantwort, die durch einige virale Vektoren ausgelöst wird, vermieden werden.

In einigen Fällen kann es nötig sein, nur bestimmte Zielgewebe in die Therapie einzuschließen. Zu diesem Zweck ist eine hohe Gewebespezifität nötig. Ein weiterer Umstand ergibt sich durch die Tatsache, dass einige Zellarten, wie zum Beispiel Neuronen, die Möglichkeit zur Replikation verloren haben und sich somit die Infektion dieser Zellen als problematisch erweist. Die Einschleusung von DNA erfolgt am einfachsten während der Phase der Zellteilung, da sich hier der Zellkern auflöst und nicht erst penetriert werden muss. Wünschenswert wäre aber ein Vektor, der auch Zellen infizieren kann, die die Fähigkeit zur Zellteilung nicht besitzen.

Auch die Größe der Vektoren stellt unter Umständen einen limitierenden Faktor dar, da einige therapeutisch wichtige Gene besonders groß sind und daher nur von Vektoren transportiert werden können, die eine ausreichende Kapazität besitzen (11).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden eine große Anzahl unterschiedlicher Systeme zur intrazellulären Genübertragung erforscht. Diese Tatsache macht deutlich, dass der „perfekte Vektor“, der all die oben genannten Eigenschaften vereint bislang noch nicht gefunden wurde.

1.4.1 Non-virale Vektoren

Obwohl virale Vektoren seit dem Beginn der Gentherapie an als effiziente Überträger angesehen und verwendet wurden, gewinnen non-virale Vektoren immer mehr an Interesse. Dies ist im Wesentlichen durch die Nachteile begründet, die sich im Zusammenhang mit viralen Vektoren ergeben. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist die Immunogenität des menschlichen Körpers dem fremden Organismus gegenüber (8). Häufig führen überschießende Immunreaktionen des Empfängers dazu, dass die

körperfremden Viren frühzeitig eliminiert werden, was den Misserfolg der teils lebenswichtigen Therapie zur Folge hat.

Zudem birgt die Verwendung von Viren prinzipiell ein Sicherheitsrisiko, auch wenn allgemein angenommen wird, die verwendeten Viren seien nicht humanpathogen und somit ungefährlich für den Menschen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch nicht humanpathogene Keime im menschlichen Körper ihre pathogene Aktivität wiedererlangen.

Sowohl die unerwünschte Immunantwort, als auch mögliche Mutationen der eingeschleusten Gene können zu einem Scheitern der Therapie führen. In diesem Falle würde das Virus selbst frühzeitig zerstört, bevor ein therapeutischer Effekt erzielt wird oder die infizierten Zellen würden durch den veränderten Virus zugrunde gehen (12).

Dies sind einige der Gründe, warum die Forschung zunehmend non-virale Vektoren in Betracht zieht. Ein weiterer Vorteil wäre, dass diese Überträgersysteme eine höhere Kapazität besitzen und somit auch größere Gene problemlos transportieren können. Ihre Herstellung ist einfacher und billiger als die der viralen Vektoren, da die für die Produktion benötigten Plasmide sich z.B. leicht in Bakterien wie *Escherichia coli* anzüchten lassen. Auch lassen sich diese Vektoren leichter konservieren und können teilweise über mehrere Jahre bei nur 4 °C aufbewahrt werden, wohingegen Viren eingefroren werden müssen und nur für einen begrenzten Zeitraum gelagert werden können (8).

Die einfachste Möglichkeit des non-viralen Gentransfers ist die direkte Übertragung nackter Plasmid DNA (13). Hierbei werden Plasmide direkt in das Zielgewebe oder intravenös injiziert. Diese Methode macht man sich vor allem bei der Antitumor-Impfung zunutze, bei der es durch den Transfer bestimmter Zytokine und Gene zu

einer Hemmung des Tumorwachstums oder zu einer Immunantwort gegen den Tumor kommt (14).

Neben der direkten Injektion wurden physikalische Methoden entwickelt, um die DNA in die Zielzellen einzuschleusen. Dazu gehören die sog. „Gene gun“ sowie die Elektroporation (15, 16). Das Prinzip der Elektroporation besteht darin, die Zellmembran über ein elektrisches Feld für die DNA durchlässig zu machen, um die Gene möglichst nah an den Zellkern heranzuführen und somit eine besonders effiziente Aufnahme zu erreichen. Bei der „Gene gun“ hingegen wird die Plasmid-DNA an feinste Goldpartikel gekoppelt und gemeinsam mit diesen in das Gewebe „geschossen“. Auch so gelangt die DNA direkt zu den Zielzellen.

1.4.2 Virale Vektoren

Die am häufigsten angewandte Form des Gentransfers erfolgt über Viren. Als virale Vektoren können eine Reihe unterschiedlicher Virusarten verwendet werden. Jede von ihnen besitzt andere Charakteristika bezüglich der Spezifität gegenüber Wirtszellen, der Kapazität, der Verweildauer im Organismus und auch der Zytotoxizität (17).

Insbesondere die Art des Virusgenoms selbst trägt maßgeblich zur Ausprägung der Merkmale bei. Viren mit Einzelstrang-RNA, wie zum Beispiel Alphaviren, verweilen charakteristischerweise nur begrenzte Zeit im Organismus, sind dafür aber nur schwach immunogen wirksam und führen zu einer raschen Expression des gewünschten Gens. Auf DNA basierende Vektoren dagegen, wie beispielsweise

Adenoviren oder Adeno-assoziierte Viren, führen aufgrund ihrer Fähigkeit zum Einbau ihrer DNA in das Wirtsgenom zu einer Langzeitexpression (17). Diese Vorteilhaftigkeit muss jedoch angesichts des durch die Erbgutveränderung gesteigerten Risikos der Krebsentstehung relativiert werden (18).

Im Allgemeinen bestehen virale Vektoren aus Nukleinsäure-enthaltenden Viruspartikeln, die mit einem Kapsidprotein ummantelt sind. In einigen Fällen kommt noch eine weitere Hüllstruktur hinzu. Normalerweise werden einige typische, für die Replikation benötigte Virusstrukturen zerstört, um eine ungewollte Vermehrung des Virus im Organismus zu verhindern und somit mehr Sicherheit zu gewährleisten. Außerdem hat sich gezeigt, dass diese Maßnahme die Toxizität der Viren vermindert und somit das Zellüberleben verbessert. Zudem besteht die Möglichkeit, gewebespezifische Promotoren beizufügen, um eine ausschließliche Infektion des Zielgewebes zu gewährleisten (17).

Die in der Gentherapie am häufigsten verwendeten Virusfamilien sind Retroviren, Herpesviren, Adenoviren sowie Adeno-assoziierte Viren.

Retroviren sind Viren mit Einzelstrang-RNA, die die Fähigkeit besitzen, über die reverse Transkriptase ihr Genom in DNA umzuschreiben und direkt in die Wirtszelle zu integrieren. Hierdurch wird eine Langzeitexpression des gewünschten Gens erreicht. Retroviren (v.a. das Moloney murine leukemia virus) sind in der Lage eine sehr große Anzahl von Wirtszellen effizient zu infizieren. Da ihnen jedoch die Fähigkeit fehlt, die Membran des Zellkerns zu durchbrechen, ist es ihnen nicht möglich, ihr Genom in mitotisch inaktive Gewebetypen, wie zum Beispiel Neuronen, einzubauen. Nur sich teilende Zelltypen sind diesen Viren zugänglich.

Lentiviren, die ebenfalls zur Familie der Retroviren gehören, haben hingegen die Fähigkeit, sowohl teilungsfähige, als auch teilungsunfähige Zellen zu infizieren.

Viruseigene Enzyme und Proteine befähigen das Virus, die Membran des Zellkerns zu durchbrechen. Viren, denen diese Proteine fehlen, sind auf die mitotische Aktivität der Zielzelle angewiesen, um in den Kern zu gelangen. Sobald die DNA im Zellkern angekommen ist, wird sie durch die Integrase in das Wirtsgenom eingebaut und die viralen Proteine werden von der Zelle exprimiert.

Die in der Gentherapie am häufigsten verwandten Vektoren dieser Gruppe basieren auf dem Human Immunodeficiency Virus (HIV) oder ähnlichen Immunodefizienzviren. Gegenüber der therapeutischen Anwendung dieser Viren existieren verständliche Vorbehalte. Es wird zum einen befürchtet, die Vektoren könnten beim Menschen zu einer HIV Infektion führen, zum anderen besteht die Angst vor Genmutationen durch die Aktivierung von Protoonkogenen (19).

Der große Vorteil der Familie der Herpesviren ist ihr enormes Aufnahmevermögen für heterologe DNA, welches bis zu 50 kb reicht. Davon abgesehen, können diese doppelsträngigen DNA-Viren in eine latente Phase übergehen und sind somit hervorragend für Anwendungen geeignet, bei denen eine sehr lange Expressionsdauer nötig ist. Nach Infektion einer Zelle kommt es zur Aktivierung der sog. „Immediate early (IE) genes“. Diese sind nicht nur essentiell für die Replikation des Virus, sondern haben teilweise auch toxische Wirkung auf viele unterschiedliche Zelltypen. Durch Ausschalten der verantwortlichen Gene kann man diesen Nachteil umgehen und die Herpesviren mit ihrer großen Aufnahmekapazität vielen klinischen Anwendungen zugänglich machen (20).

Die am häufigsten verwandten Viren sind die DNA-haltigen Adenoviren. Diese doppelsträngigen Viren sind gekennzeichnet durch eine breite Spanne an Wirtszellen

- nicht-mitotische Zellen inklusive - sowie eine sehr starke Genexpression und die relativ einfache Herstellung mit sehr hohen Titern (21). Bei anfänglichen Versuchen kam es zu toxischen Nebenwirkungen und einer starken Immunreaktion auf den Virus, was in den Folgegenerationen durch Auslöschen bestimmter virus-spezifischer Gene unterbunden werden konnte (22).

1.5 Adeno-assoziierte Viren

Im Jahre 1965 wurde das humane Adeno-assoziierte Virus (AAV) – ursprünglich eine Verunreinigung einer Adenovirenpräparation - erstmals entdeckt (23). Ca. 30 Jahre später, im Jahre 1995, wurde es erstmalig therapeutisch beim Menschen eingesetzt (24). Anfangs wurden AAVs hauptsächlich im Zuge der Behandlung der Cystischen Fibrose untersucht und verwendet. Bei dieser autosomal rezessiven Erkrankung besteht eine Mutation im CFTR-Gen, welche zu funktionellen Veränderungen der Chloridkanäle insbesondere der Epithelzellen führt. In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Aerosol-Inhalation von mit therapeutischen Genen beladenen Viruspartikeln zu deutlichen Verbesserungen der Lungenfunktion gegenüber Placebogruppen führt (25). Nach dieser ersten erfolgreichen gentherapeutischen Anwendung von Adeno-assoziierten Viren werden bis heute 11 verschiedene Typen in der klinischen Forschung verwendet (26).

Die Adeno-assoziierten Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviren. Obwohl ein Großteil der Menschen seropositiv für adeno-assoziierte Viren ist, konnte bisher keine Erkrankung mit ihnen in Verbindung gebracht werden. Sie gehören zu den kleinsten, aus Einzelstrang-DNA bestehenden Viren und benötigen zur Replikation ein sog. Helfervirus (z.B. Herpesvirus oder Adenovirus), weshalb sie auch als

„Dependoviren“ bezeichnet werden. Bei Fehlen eines solchen Helfervirus kann das Virus in einem latenten Zustand in der Wirtszelle persistieren (27). Der Durchmesser des AAV bemisst sich mit 18-26 nm und seine äußere Form ist icosaedrisch (26).

(Abbildung 1)

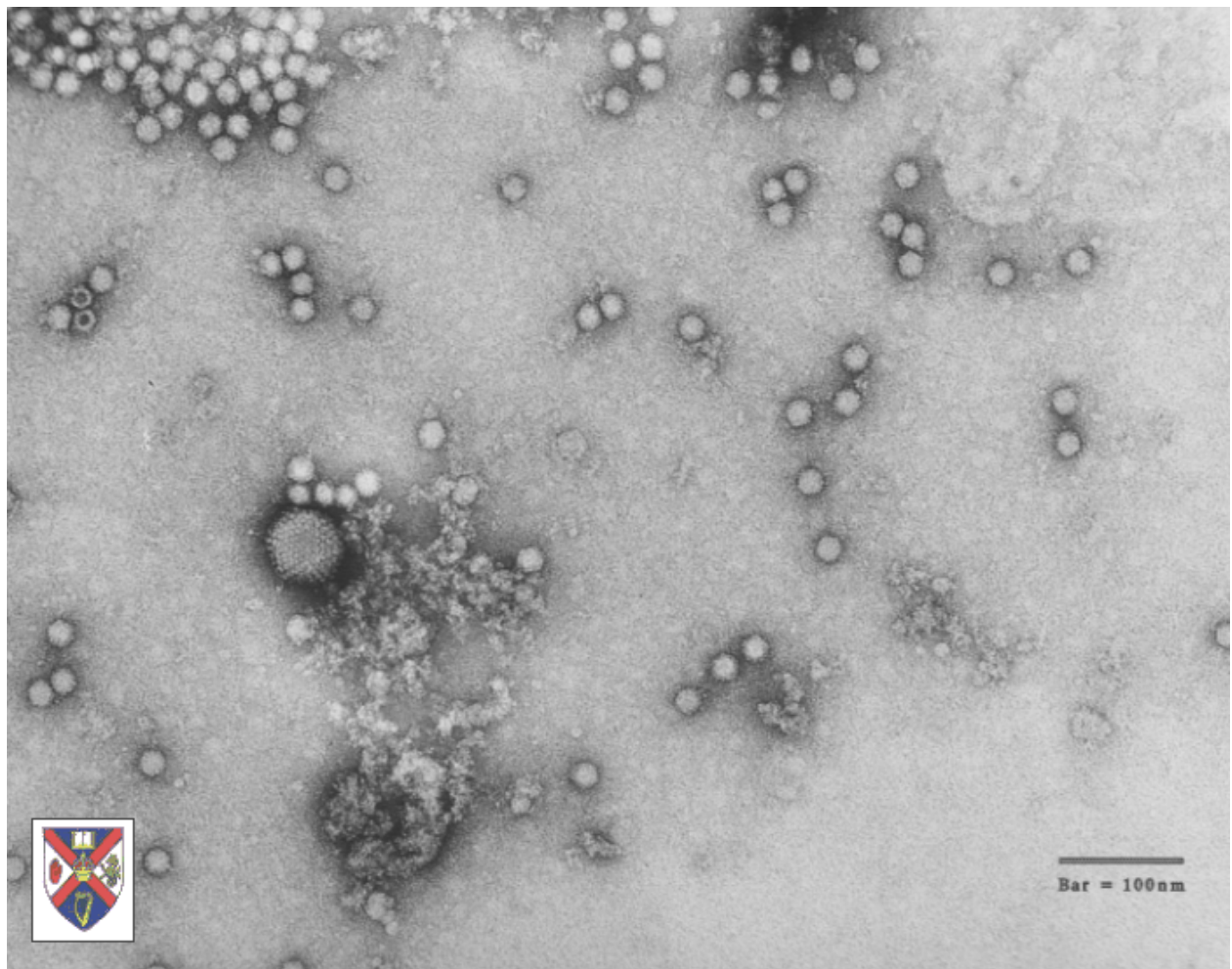


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme Adeno-assoziiierter Viren (28)

Das AAV besteht hauptsächlich aus zwei großen sog. „open reading frames“ (ORF), welche vor allem die für die Vermehrung wichtigen Gene „*rep*“ und „*cap*“ beinhalten und die von sog. „inverted terminal repeats“ (ITR) auf beiden Seiten flankiert werden. Das *rep*-Gen wiederum enthält 4 Replikationsproteine (Rep 78, 68, 52, 40), die den Lebenskreislauf des Virus beeinflussen. Das *cap*-Gen besteht aus 3 Proteinen (VP1, VP2, VP3), die für die Bildung des Viruskapsids von Bedeutung sind. Die ITR besitzen eine Primerfunktion, verfügen zudem über Bindungsstellen für das *rep*-Gen und beinhalten Sequenzen, die zur Intergration in die Wirtszelle benötigt werden (29).

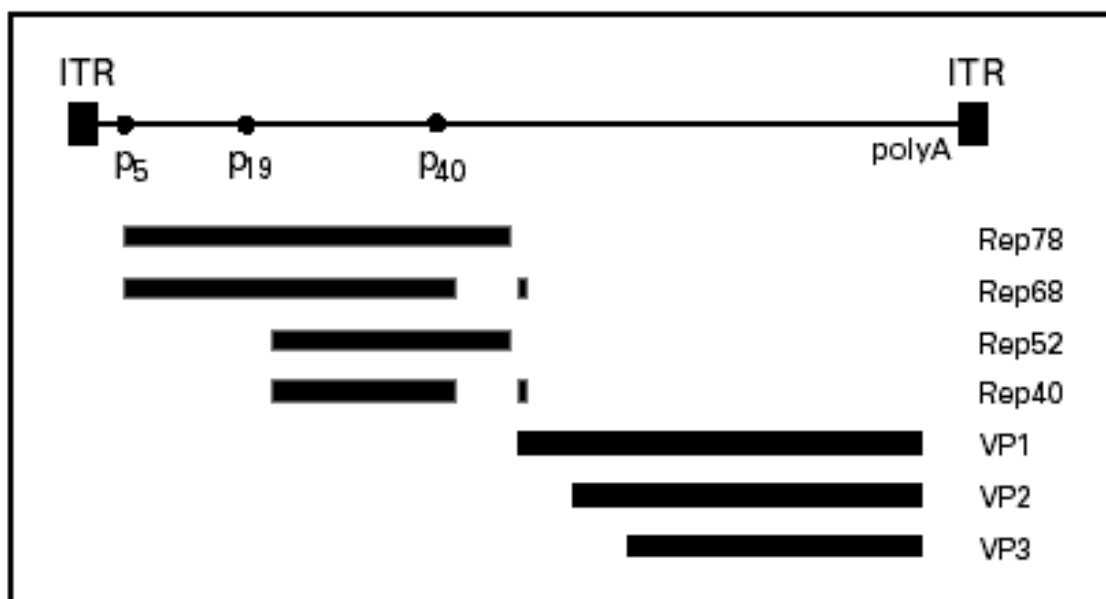


Abbildung2: Schematische Darstellung des AAV2-Genoms. Das Wildtyp-Genom enthält 4680 Nukleotide (29).

Um als Vektor für den Gentransfer fungieren zu können, werden beide ORF der Adeno-assoziierten Viren durch das einzuschleusende Transgen ersetzt. Nur die für den Virus essentiellen ITR bleiben erhalten.

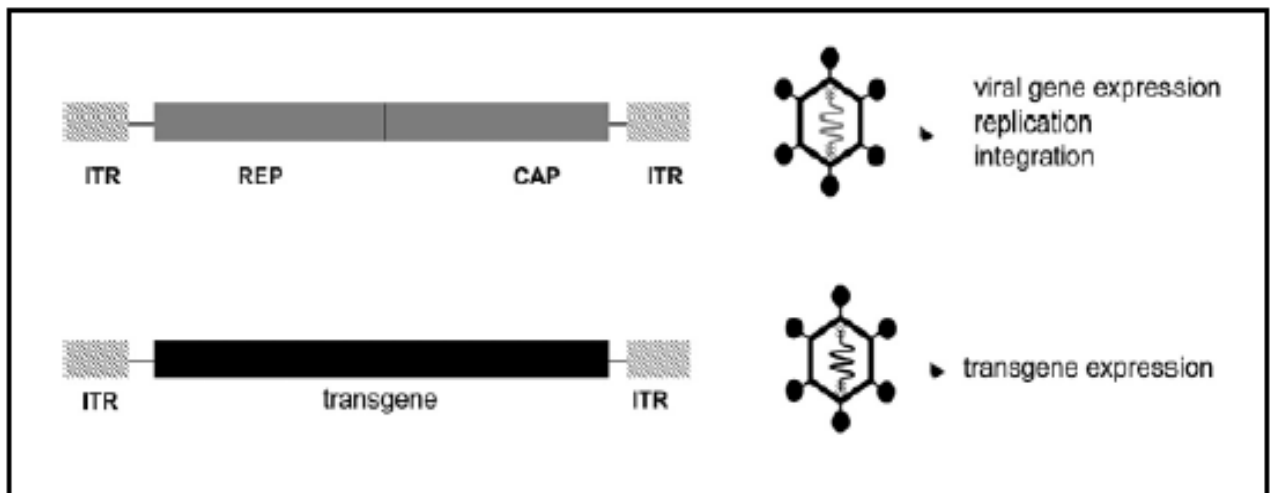


Abbildung3: Schematische Darstellung von Wildtyp und rekombinantem AAV2. Für die Produktion von rAAV2 wurden beide ORF durch das Transgen ersetzt. Dadurch sind die viralen Funktionen wie Integration, Replikation und erneute Virusproduktion im rAAV2 nicht vorhanden. (29)

Leider besitzen die AAV nur eine begrenzte Kapazität für die Aufnahme therapeutischer Gene. Vor allem die Größe dieser Gene ist hierfür ausschlaggebend. Ein weiteres Problem stellt die Produktion dieser Vektoren in großer Menge dar. Hierzu konnte noch kein effizientes und einfaches Verfahren entwickelt werden. Dennoch hat das AAV auch Vorteile, die es zu einem geeigneten Vektor für die Gentherapie machen.

Es wird nach heutigen Erkenntnissen angenommen, dass das AAV ein apathogenes Virus ist. Obwohl ungefähr 80% der Menschen seropositiv für diese Form der Parvoviren sind, ist bislang keine AAV-assoziierte Krankheit bekannt (10). Das AAV besitzt die Eigenschaft, sowohl teilungsunfähige, als auch fertig ausdifferenzierte Gewebe (wie z.B. Skelettmuskulatur) zu infizieren. Es wird vermutet, dass die Ursache hierfür ein Heparansulfatproteoglykan (HSPG) ist, welches auf unzähligen unterschiedlichen Gewebetypen zu finden ist und dem Virus als Rezeptor dient (30). In diesem Prinzip ist auch die hohe Gewebsspezifität der verschiedenen Serotypen begründet. So lassen sich für unterschiedliche Anwendungen jeweils passende Serotypen auswählen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die Serotypen untereinander zu kombinieren, z.B. das Virusgenom von AAV2 mit dem Kapsid desjenigen Typen zu verbinden, welcher den besten für das Zielgewebe geeigneten Gewebstropismus besitzt. Dieses sog. „Pseudotyping“ lässt sich ebenso bei vorbestehender Immunisierung gegen Kapsidkomponenten bei AAV2-seropositiven Patienten nutzen (31).

Die Integration des Virusgenoms ins Erbgut erfolgt bevorzugt in einem bestimmten Abschnitt auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 19 (32). Dies ist ein einmaliges Phänomen unter allen bisher bekannten eukaryoten Viren und es wird vermutet, dass dieser gezielte Einbau entscheidend zu einer sicheren und stabilen Expression des gewünschten Genes beiträgt (33). Die Gefahr von Mutationen und unerwünschten Änderungen der Gensequenzen wird vor diesem Hintergrund zusätzlich verringert. Die stabile Genexpression über einen Zeitraum von bis zu mehreren Jahren ist unter anderem zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden immunsuppressiven Therapie bei Transplantationen unverzichtbar.

1.6 Einschleusung von IDO, CTLA4Ig und IL-10

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte dreier unterschiedlicher Gene auf das Überleben von Herztransplantaten bei Ratten untersucht werden. Dies sind zum einen Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO), außerdem CTLA4Ig, ein Fusionsprotein aus dem mit zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierten Antigen 4 und dem humanen IgG1, und schließlich Interleukin 10 (IL-10). Ihnen allen wird eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen, die über verschiedene Mechanismen zustande kommt.

Die Indoleamin 2,3-Dioxygenase ist ein Enzym, welches hauptsächlich in der Plazenta exprimiert wird und eine entscheidende Rolle in der Schwangerschaft spielt. Sie verhindert durch die Unterdrückung der T-Zell-Antwort eine Abstoßung des Fetus vom mütterlichen Körper (34). Dieser Mechanismus der natürlichen Immunsuppression soll versuchsweise in der Organtransplantation genutzt werden (35). Biochemisch wandelt die IDO die Aminosäure Tryptophan zunächst zu Kynurenin und über weitere Metabolite schließlich zu Nikotinamid um. Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht bekannt. Anfangs wurde der Verbrauch von Tryptophan als essentielle Aminosäure durch IDO hauptsächlich als eine Form der Abwehr gegen intrazellulär pathogene Keime und als Schutz vor Tumorzellwachstum gewertet (36). Jedoch scheinen auch die dabei entstehenden Metaboliten selbst eine immunmodulatorische Wirkung zu besitzen und können ein verlängertes Überleben von Transplantaten bewirken (35).

Für eine T-Zell-gesteuerte Immunantwort sind sowohl MHC Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen, als auch Zellrezeptoren auf Helfer-T-Zellen notwendig. Auch kostimulierende Signale spielen für die T-Zell-Aktivierung eine entscheidende Rolle:

B7 auf APCs bindet an CD28 auf Helferzellen, was eine vollständige Aktivierung des T-Zellsystems auslöst. An dieser Stelle setzt die Funktion von CTLA4Ig an. Dies ist ein Fusionsprotein aus dem humanen IgG1 und CTLA4, welches auf aktivierten zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird. CTLA4Ig ist dem CD28 nicht nur morphologisch sehr ähnlich, sondern weist auch eine 20mal höhere Affinität für B7 auf (37). So kann durch die Einschleusung von CTLA4Ig CD 28 geblockt, das kostimulierende Signal unterbrochen, und somit die Immunantwort unterdrückt werden (38).

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Immunantwort bei Organtransplantation bietet sich in der Verwendung von Interleukin-10 (IL-10). IL-10 ist einer der wichtigsten anti-entzündlichen Mediatoren und wird zu den immunmodulatorischen Zytokinen gezählt. Es reduziert die Antigenpräsentation über Hemmung der Synthese anderer Zytokine und verhindert somit ebenso die T-Zell-Aktivierung (39).

2. Material und Methoden

2.1 Plasmidproduktion

2.1.1 Transformation

Zur Plasmidtransformation wurden die Zellen XL-2 blue und TOP10 (Invitrogen) verwendet. Für die Herstellung der unterschiedlichen AAV-Serotypen werden besonders die entsprechenden Helferplasmide (H21, H22, H28) sowie das Plasmid dFΔ6 benötigt. Das Helferplasmid H21 dient zur Produktion von AAV1, H22 zur Herstellung von AAV2 und H28 zur Herstellung von AAV Serotyp 8. Zunächst wurden je 0,5 µl des gewünschten Plasmids zu 100 µl der Zellen gegeben und 10-30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender zwei-minütiger Inkubation bei 42 °C, welche das Öffnen der Zellporen begünstigt, wurden 250 µl SOC Medium (Invitrogen) ohne Antibiotikum beigefügt und eine weitere Inkubationszeit von 40-60 Minuten bei 37 °C angeschlossen. Daraufhin wurden je 30-50 µl der Probe auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.2 Kultivierung und Extraktion

Zur weiteren Kultivierung ausreichender Mengen an gewünschten Plasmiden wurden einzelne Bakterienkolonien von den Agarplatten in 500 ml LB-Broth überführt und abermals über 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Extraktion der Plasmide aus der Nährlösung erfolgte mithilfe eines „HiSpeed Plasmid Maxi Kits“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht

auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der anschließenden Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule. Nach Ausschwemmen der DNA mit Hilfe eines salzhaltigen Puffers wird die DNA konzentriert und mit Isopropanol gewaschen um unerwünschte Rückstände zu entfernen.

Zur Überprüfung der extrahierten Plasmide wurden diese mithilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Je nach Serotyp wurden hierzu die Endonukleasen BamHI und EcoRI in ausreichender Menge zugefügt und zusammen mit der Plasmid-DNA eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt und die Längen der geschnittenen Banden miteinander verglichen. Die Messung der Plasmid-Konzentration erfolgte in einem Massenspektrometer bei 480 nm. Die gewonnenen Konzentrationen sollten zwischen 500 -1500 µg/ml liegen.

Im Rahmen der Durchführung der Versuchsreihen traten regelmäßig Komplikationen bei der Extraktion des Plasmids dFΔ6 mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Maxi Kits auf. Es wurden wiederholt sehr niedrige Konzentrationen von nur 100-200 µg/ml erreicht. Dieser Umstand kann am ehesten auf die Größe des Plasmids von rund 15424 bp zurückgeführt werden. Vermutlich ist das angewandte System für Plasmide von solcher Größe nicht optimal geeignet.

2.2 Virusherstellung

2.2.1 Zellkultur

Zur Virusherstellung wurde die Zelllinie HEK-293 (humane embryonale Nierenzellen) verwendet. Die Zellen wurden in komplettem DMEM-Medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 4,5 g/l Glukose und 10% fetalem Rinderserum sowie unter

Zugabe von Penicillin und Streptomycin angezüchtet und in zweitägigem Abstand gesplittet.

2.2.2 Transfektion

24 Stunden vor Transfektion wurden die Zellen auf eine Anzahl von etwa 6×10^6 Zellen pro Zellkulturflasche (T-75) angezüchtet und mit komplettem DMEM versorgt. Die Zellkonfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion sollte etwa 70% betragen.

Ein bis zwei Stunden vor Transfektion wurde das Komplettmedium durch 25 ml vorgewärmtes IMDM (Iscove modified Dulbecco Medium) mit 10% fetalem Rinderserum und ohne Zusatz von Antibiotikum ersetzt.

Pro Zellkulturflasche wurden jeweils 25 µg pFΔ6 mit 12,5 µg des Plasmids für den jeweiligen Serotypen (H21, H22 oder H28) sowie 12,5 µg des gewünschten zu übertragenden therapeutischen Gens mit 330 µl 2,5 M CaCl_2 gemischt und mit destilliertem Wasser auf 2,75 ml aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde das Gemisch gefiltert (0,2 µm Spritzenfilter)

Für jede Zellkulturflasche wurden 2,5 ml der CaCl_2 /DNA Lösung in ein frisches Falcontube pipettiert. Nach Zugabe von je 2,5 ml 2xHeBS-Puffer (50 mM HEPES, 280mM NaCl, 1,5 mM Na_2PO_4 pH 7,10) wurden die Gemische unter stetiger Luftzufuhr mit Hilfe einer Pasteurpipette für 15-20 Sekunden inkubiert.

Nach weiteren 2 Minuten wurde die entstandene Mischung zügig, aber tropfenweise auf die Zellkulturflaschen verteilt (je 5 ml). Nach 8 bis 15 Stunden wurde das Medium nach einmaligem Waschen mit DMEM durch 25 ml komplettes DMEM (Low Glucose, 10% fetales Rinderserum, Penicillin/Streptomycin) ersetzt.

Nach weiteren zwei Tagen Inkubation konnten die erfolgreich infizierten Zellen geerntet werden. Hierzu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und nach vorsichtigem Lösen vom Flaschenboden in je 10 ml PBS gesammelt. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 1500 rpm für 5 Minuten (4 °C) wurde das entstandene Zellpellet erneut in je 10 ml 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe von Natriumdeoxycholat (Endkonzentration 0,5%) und Benzonase (Endkonzentration 50 U/ml) folgte eine Inkubationsphase von 30-40 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad.

Hierauf wurden die Zellen durch wiederholtes Einfrieren auf Trockeneis und anschließendes Auftauen im Wasserbad lysiert und wiederum für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand filtriert und so von Verschmutzungen und Rückständen gereinigt.

2.2.3 Virusisolation

2.2.3.1 Iodixanol-Gradient

Die Virusisolation erfolgte über einen diskontinuierlichen Iodixanol-Gradienten (OptiPrep). Als Protokoll hierzu diente das OptiPrep™ Application Sheet „M4 Purification of recombinant adeno-associated virus (rAAV) and parvovirus in pre-formed iodixanol gradients“. Iodixanol, welches ursprünglich als ein iodiertes Röntgenkontrastmittel verwendet wurde, ist aufgrund seiner isoosmotischen Eigenschaften gut als Medium für Dichtegradienten geeignet. Diese Methode wurde erstmals von Zolotukhin et al beschrieben (40).

Zu diesem Zweck wurde ein Gradient aus unterschiedlichen Iodixanolkonzentrationen gebildet. Zuunterst eine Schicht mit 54% Iodixanol,

überlagert von 40%, 25%, 15% sowie dem klaren Zelllysats (Abbildung 4). Die verschlossenen Tubes wurden für 1 Stunde bei 18°C und ca. 69000 rpm freischwingend (Rotor: Type 70Ti, Beckman) zentrifugiert. Anschließend wurde die, den Virus enthaltende 40% Iodixanol-Fraktion mithilfe einer Kanüle abpunktiert.

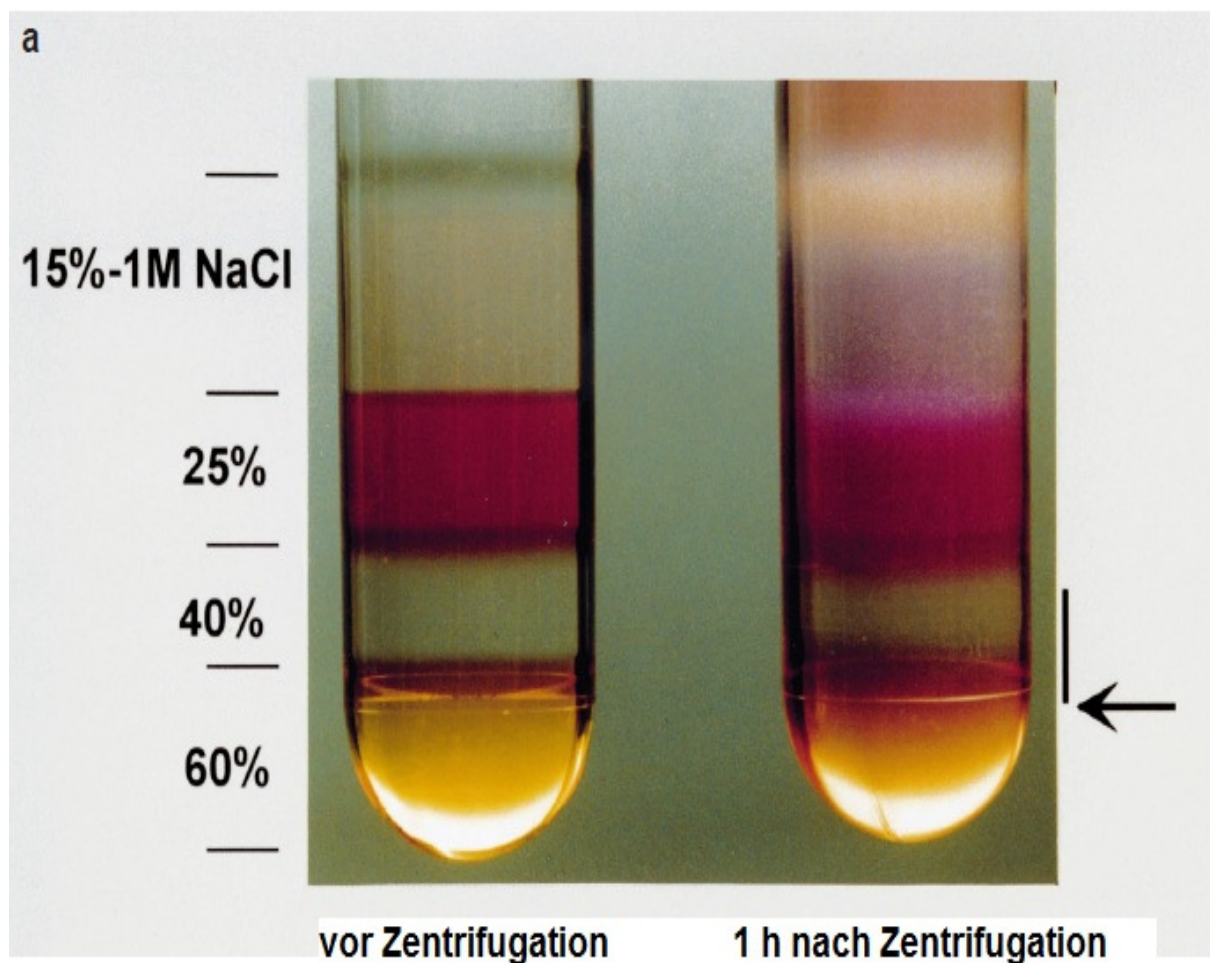


Abbildung 4: Iodixanol-Gradient zur Reinigung von AAV links vor, rechts nach einstündigem Zentrifugieren; Angabe der Dichtegrade auf der linken Seite; der vertikale Strich auf der rechten Seite gibt die Lokalisation von AAV an; der Virus wird mit Hilfe einer Nadel abpunktiert (40)

2.2.3.2 Säulenchromatographie

Im Anschluss wurde die hergestellte virusenthaltende Fraktion mittels Säulenchromatographie weiter gereinigt und konzentriert. Hierzu wurde eine 5 ml HiTrapQ HP–Säule verwendet (GE Healthcare) (41). Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Lösungen wurden Puffer A (20 mM Tris, 15 mM NaCl, pH 8.5) und Puffer B (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH8.5) verwendet. Die Äquilibration der Säule erfolgte durch Zugabe von 25ml Puffer A (5x das Volumen der Säule), gefolgt von 25ml Puffer B, und wiederum 25ml Puffer A. Das durch den Iodixanol-Gradienten gewonnene Lysat wurde 1:1 mit Puffer A verdünnt und auf die Säule geladen. Das anschließende Waschen erfolgte erneut mit Puffer A (50ml). Zuletzt wurde der Virus mit 20ml Puffer B ausgewaschen und in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt.

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung des gewonnenen Virus erfolgte durch real time PCR (rt-PCR). 1 µl des gewonnenen Virus wurde mit 99 µl eines Andauungs–Puffers (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) verdünnt. Der Puffer enthielt außerdem DNase I (350 µg/ml). Die Proben wurden zuerst für 30 Minuten bei 37 °C und anschließend für 10 Minuten bei 90 °C inkubiert. Proteinkinase K wurde in einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugefügt und es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C. Für die rt-PCR wurden 2,5 µl der Proben mit einem Standard Taqman-Master-Mix (PE-Applied Biosystems) gemischt. Eine Standardkurve wurde mithilfe eines leeren AAV–Genoms erstellt.

2.3 Tiere und Chirurgische Maßnahmen

Für die Herztransplantationen im Tierversuch wurden LEW und F344 Ratten von Charles River, Sandhofer, Deutschland verwendet. Die Tiere hatten ein mittleres Gewicht von 200-250 g und wurden im Tierlabor der Universität Regensburg gehalten.

Alle chirurgischen Maßnahmen wurden unter strenger Berücksichtigung internationaler Leitlinien durchgeführt und waren von der Regierung genehmigt. Die Ratten dienten als Spender bzw. Empfänger der heterotopen Herztransplantate. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Mischung aus Ketamin (75mg /kg) und Xylazin (10 mg/kg) anästhesiert. Danach wurde der Ratte zur Heparinisierung eine Natrium–Heparin–Lösung (200 Units/ kg) in die dorsale Penisvene injiziert. Eine mediane Laparotomie erfolgte in Rückenlage. Es folgte eine Perfusion des Herztransplantats in situ mit 50 ml eiskalter HTK-Lösung (Custodiol®). Die Venae cavae inferior und superior sowie die rechte und die linke Pulmonalvene wurden mit einer 5-0 Naht ligiert. Der Truncus pulmonalis wurde durchtrennt und die Aorta ebenfalls ligiert.

Anschließend erfolgte die Injektion von 1×10^{12} Genomen des jeweiligen AAV–Vektors in die ligierte Aorta und somit über die Koronararterien in das Herzgewebe. Die Tiere wurden in die folgenden Gruppen eingeteilt (n=Anzahl der Tiere pro Gruppe):

Kontrollgruppe ohne Behandlung mit AAV (n=6), ausschließliche Zugabe von AAV (n=6), AAV+IDO (n=6), AAV+CTLA4Ig (n=6), AAV+IL-10 (n=6), Behandlung nur mit Cyclosporin A (CsA) (n=9), CsA+AAV (n=7), CsA+AAV/IDO (n=6), CsA+AAV/CTLA4Ig (n=9) sowie CsA+AAV/IL-10 (n=6).

Nach einer Aufbewahrung der Transplantate für 6 Stunden bei 4 °C erfolgte die heterotope Transplantation. Hierbei wurden die Aorta sowie der Truncus pulmonalis

des Organs jeweils mit der Aorta abdominalis bzw. der Vena cava inferior des Empfängers End-zu-Seit anastomosiert.

2.4 Histologie, Immunhistochemie und ELISA

Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation Plasma- sowie Organproben entnommen (Tag 30, 60, 90, 120, 150, 180). Die Gewebeproben wurden nach Entnahme schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Beurteilung der Immunhistochemie, der Intimaproliferation und der Kollagenansammlung in den Organen wurden verschiedene Färbungen der Präparate angewandt. Die je etwa 8 µm dicken Präparate wurden senkrecht zur Längsachse von der Herzspitze zur Basis geschnitten. Es wurden jeweils HE Färbungen, Verhoff-Färbungen und Masson-Trichrom-Färbungen zur besonderen Darstellung von Kollagenfasern in den Schnitten angefertigt.

Für die Analyse der Genexpression und der zellulären Infiltrate wurden die folgenden Antikörper benutzt: Monoklonale Maus anti-human CTLA4-Antikörper, Maus anti-human IDO-AK, Maus anti-human IL-10-AK, Maus anti-Ratte Makrophagen-AK. Die Beurteilung erfolgte durch Immunfluoreszenz oder die indirekte Immunoperoxidase-Methode. Dabei wurde zunächst die endogen wirksame Peroxidase durch 30-minütige Inkubation in PBS mit 1% H₂O₂ gehemmt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4 °C mit den primären Antiseren, 1:100 verdünnt. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe folgte hierauf die Zugabe eines Peroxidase-Komplexes in einer 1:100-Verdünnung. Nach ca. 1 Stunde konnte die Peroxidase-Aktivität durch Inkubation in einer 0,015 % 3-

3'diaminobenzidin-Lösung (DAB) in 0,01M Tris Puffer bei pH 7,6 zur Darstellung gebracht werden.

Die löslichen Formen von humanem CTLA4Ig und humanem IL-10 wurden durch ELISA wie folgt gemessen: Rekombinantes hCTLA4/Fc Protein wurde als Standard verwendet. Die Serumproben wurden auf eine mit einem anti-hCTLA4 polyklonalem Ziegenantikörper (2 µg/ml) beschichtete 96-well ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden zuerst biotinhaltige anti-hCTLA4 Ziegenantikörper (1 µg/ml) und nach einstündiger Inkubationszeit eine 1:1000 Avidin-Peroxidase-Konjugatlösung zugegeben. Im Anschluss an eine weitere Stunde Inkubation und nach Zugabe von 2, 2-Azino-bis-Substratlösung kam es nach 10 Minuten bei Raumtemperatur zu einer Farbentwicklung, deren optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem dafür vorgesehenen Lesegerät gemessen werden konnte.

Zur Bestimmung des löslichen IL-10 wurde das gleiche Vorgehen mit entsprechenden Antikörpern angewandt.

2.5 Analyse der Organarteriosklerose

Die Einteilung der Intimaproliferation erfolgte in 5 Stufen:

Grad 0: keine Intimaproliferation

Grad 0,5: minimale Intimaproliferation

Grad 1: 5-25%

Grad 2: 25-50%

Grad 3:>50%

Die Beurteilung erfolgte nach Verhoff-Hämatoxylinfärbung. Alle Untersuchungen diesbezüglich wurden doppelblind an mindestens 50 Schnitten pro Organ und 3-5 Organen pro Gruppe vorgenommen.

2.6 Anti-Donor-Antikörper

Am Tag 200 nach Transplantation wurden Empfängerseren entnommen und mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf Isotypen-spezifische Antikörper getestet. Hierzu wurden Zellsuspensionen aus den Thymozyten der Spendertiere hergestellt und mit den verdünnten und hitzeinaktivierten Serumproben inkubiert. Um die Anwesenheit der Antikörper zu untersuchen, wurden die folgenden Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörper verwendet: Maus-anti-Ratte IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c und IgM (BD Pharmingen).

Die Höhe der Antikörper-Level wurde als mittlere Kanalfuoreszenz gemessen und es wurde der Quotient aus Serumprobe und normalem Rattenserum berechnet.

2.7 RNase protection assay und quantitative real-time PCR

Zur Gewinnung und Säuberung von RNA aus den Herztransplantaten wurde der RNeasy-Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer Lyse und einer anschließenden Homogenisierung der Gewebeproben. Daraufhin erfolgt mit Hilfe eines speziellen Puffersystems eine Bindung an eine silikatische Membran. Nach Ausschwemmen unerwünschter Materialien kann gesäuberte und qualitativ hochwertige RNA aus der Säule eluiert werden.

Auch der „RNase protection assay“ wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu Beginn wurde je Probe 1 µg RNA mit freien, mit [³²P]UTP markierten Riboprobes hybridisiert. Nach der Andauung mit RNase wurden die Proben auf ein denaturiertes Polyacrylamidgel geladen und durch Exposition auf einem Film zur Darstellung gebracht. Quantifiziert wurden die Proben durch einen Phospho-Imager.

Die Daten wurden als Quotient aus Probe zu GAPDH (Standard) aufgeschlüsselt.

Die Expressionslevel von HO-1 wurden durch TaqMan real-time PCR gemessen (ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector).

Mit der rt-PCR kann nicht nur das Vorhandensein einer bestimmten DNA-Sequenz bestätigt werden, sondern es können auch quantitative Angaben über deren Menge gemacht werden. Die Bestimmung der DNA-Kopien erfolgt durch Messung von Fluoreszenz. Die Ergebnisse der rt-PCR kommen in Kurven zur Darstellungen. Für jede Probe wird durch die zugehörige Kurve ein Schwellenwert bestimmt (C_T =threshold cycle). Die gewonnenen Ergebnisse können durch Vergleiche dieser jeweiligen „threshold cycles“ mit internen Kontrollen (sog. „housekeeping genes“) quantifiziert werden. In den hier aufgeführten Versuchen wurde 18S rRNA als interne Kontrolle verwendet.

2.8 Statistische Analysen

Die Überlebenskurven der verschiedenen Gruppen mit jeweils unterschiedlicher Behandlung wurden nach Kaplan–Meier analysiert und im Log-Rang-Test verglichen.

Die Daten der übrigen Experimente wurden durch den ANOVA und Bonferroni-Test für mehrfache Vergleiche analysiert. Es wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

2.9 Materialien

2.9.1 Reagenzien

Benzonase	Sigma-Aldrich, München, D
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, D
Heparin	Novo Nordisk Pharma, Mainz, D
HTK Lösung Custodiol®	Köhler Chemie, Alsbach, D
IMDM	Invitrogen, Karlsruhe, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Ketamin 10%	Bayer, Leverkusen, D
LB-Broth	USB Corporation, Cleveland, USA
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München, D
OptiPrep	Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen
Penicillin/ Streptomycin	Seromed, Deisenhofen, D
PBS	Invitrogen, Karlsruhe, D
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Taqman Master Mix	PE-Applied Biosystems, Foster, CA, USA
Tris	Merck, Darmstadt, D
Xylazin	Bayer, Leverkusen, D

2.9.2 Material

Bakterien und Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen, D
Cryotubes	Nunc, Wiesbaden, D
Filter	Millipore, Schwalbach, D
Flasks, T-75	Falcon, Heidelberg, D
Falcon, Multiwell 96 well Platte	Nunc, Roskilde, Dänemark
HiTrap His Säule 1 ml	Amersham, GE, München, D
HiTrapQ HP-Säule 5 ml	GE Healthcare,
Lysepuffer	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Naht 5-0	Ethicon, Norderstedt, D
Quick-Seal Tubes	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Sterile Filter (0.22 µm)	Sartorius, Göttingen, D
Zentrifugentubes	Eppendorf, Sarstedt, D

2.9.3 Kits

ELISA	R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
RiboQuant Kit	BD Pharmingen, Heidelberg, D
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, D

2.9.4 Antikörper

Monoklonale Maus anti-human CTLA4–AK	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Maus anti-human IDO-AK	Chemicon, Temecula, CA, USA
Maus anti-human IL-10-AK	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Maus anti-Ratte IgG1, IgG2a-c, IgM	BD Pharmingen, Heidelberg, D

2.9.5 Geräte

ABI PRISM™ sequence detector	Applied Biosystems, Foster, CA
Beckman Rotor 70 Ti	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Chromatograph	ÄKTAEpress, Amersham, GE, München, D
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RBE; Leica, Heidelberg, D
Phospho – Imager	Strom, Molecular Dynamic
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Vmax Kinetic microplate reader	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA

2.9.6 Tiere und Zellen

LEW Ratten, 200-250g	Charles River, Sandhofen, D
F344 Ratten, 200-250g	Charles River, Sandhofen, D
HEK 293 – Zellen	Stratagene Europe, Amsterdam, NL

3. Ergebnisse

3.1 Ernten der Zellen nach Transfektion

Um zu überprüfen, ob das Virus die Zellen erfolgreich infizieren konnte, wurde zunächst eine Transfektion der Zellen mit AAV2.eGFP („green fluorescent protein“) durchgeführt und die Genexpression nach 1-2 Tagen unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

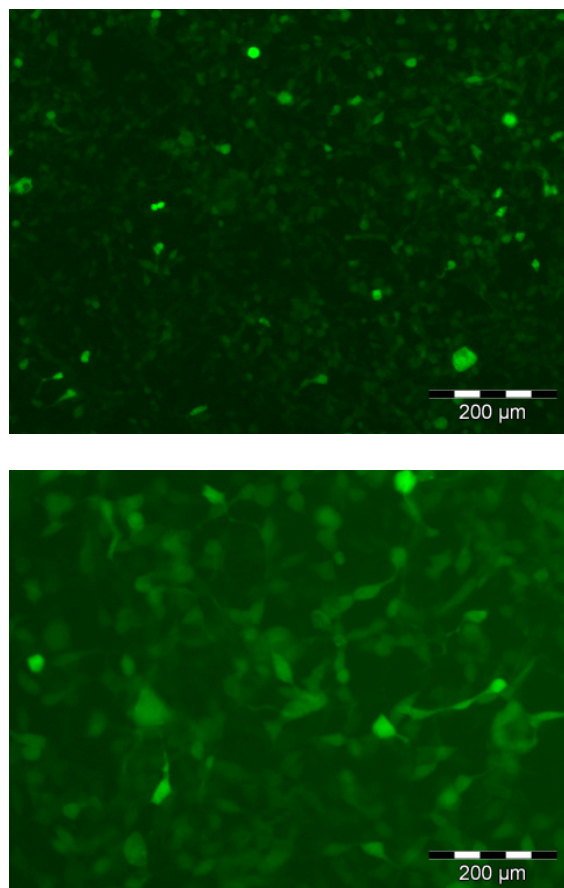


Abbildung5: Fluoreszenz von AAV2.eGFP 2 Tage nach Transfektion in 100-facher und 200-facher Vergrößerung; erfolgreich infizierte Zellen erscheinen hell grün leuchtend.

Bei zufriedenstellendem Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Ernte der übrigen Zellkulturen.

3.2 Endprodukt nach Virusisolation

Nach dem Ernten der übrigen Zellkulturen kam es durch den Einsatz von Natriumdeoxycholat und Benzonase sowie wiederholtem Einfrieren in Trockeneis und anschließendem Auftauen der Zellsuspension zur Freisetzung der enthaltenen Viruspartikel. Zur Purifikation dieser Viren wurden ein Iodixanol–Dichtegradient sowie eine Säulenchromatographie angewandt. Es ließen sich auf diesem Wege Konzentrationen von rund 10^8 bis 10^{10} Virus-Partikeln/ml erreichen.

3.3 Expression der Targetgene

Zu Beginn der Testreihe wurde untersucht, ob durch den Gentransfer mit Hilfe des zuvor produzierten Adeno-assoziierten Virus eine ausreichend hohe, andauernde und vergleichbar stabile Expression der drei unterschiedlichen Targetgene erreicht würde. Es wurden die Expression von Indoleamin 2-3-Dioxygenase (IDO), dem Fusionsprotein CTLA4Ig und von IL-10 jeweils am Tag 30 nach Transplantation bestimmt. Hierzu kamen die Maus-anti-humanen Antikörper zum Einsatz.

Bei den immunhistochemischen Analysen der transplantierten Organe zeigten sich in allen Gruppen vergleichbare Expressionen der drei Gene. In allen Proben stellten sich etwa 20% der Herzparenchymzellen positiv für die Transgenproduktion dar.

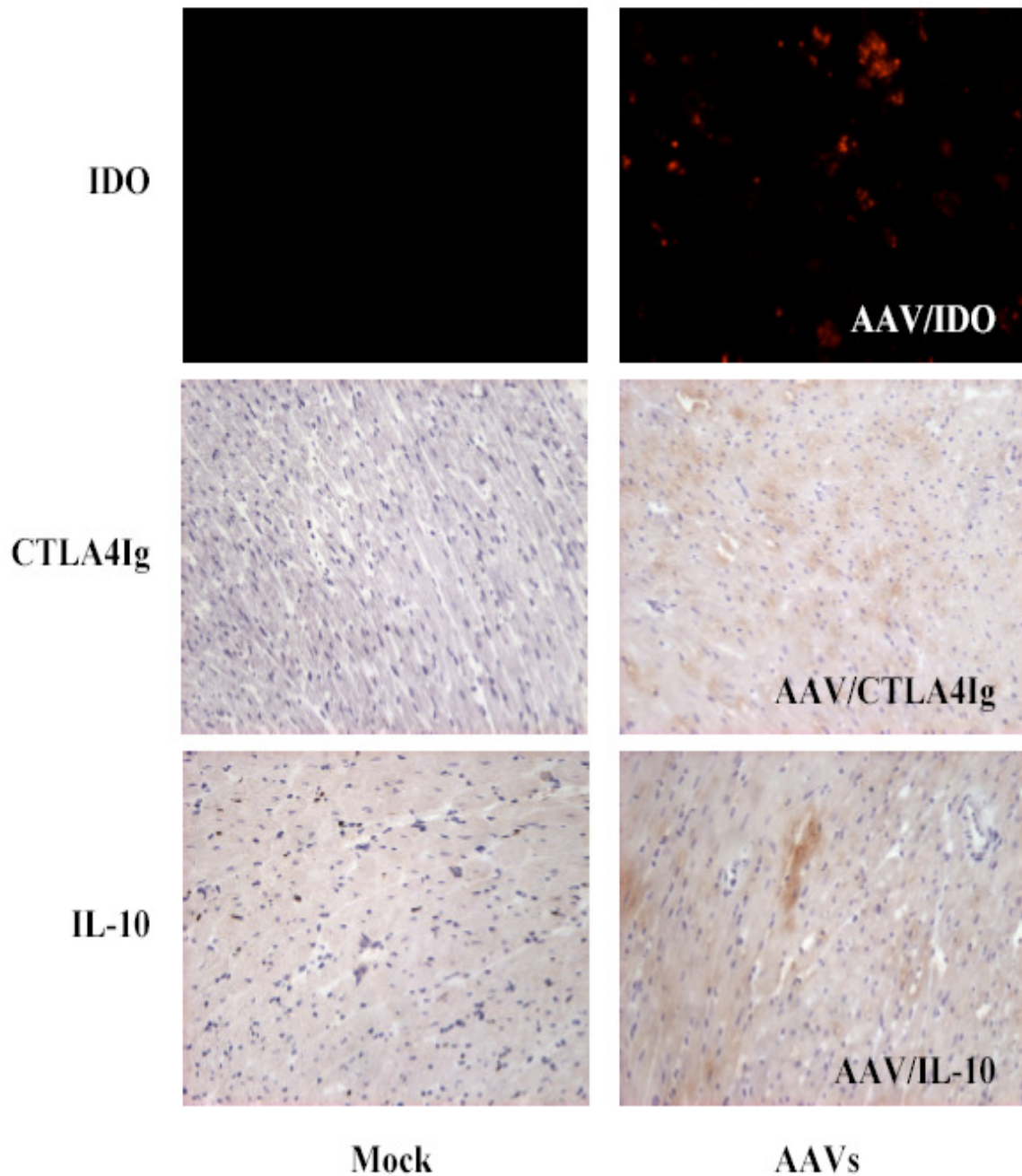


Abbildung6: Expression der von Adeno-assoziierten Viren übertragenen Transgene; Immunhistochemische Darstellung der Transgenexpression in den Transplantaten am Tag 30 nach AAV-Gabe. In etwa 20% der Parenchymzellen der Herztransplantate wurden die Zielproteine exprimiert.

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Untersuchungen wurde die Höhe der Plasmalevel der Zielproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation

mittels ELISA bestimmt. Die Messungen wurden bis 200 Tage nach Operation fortgeführt.

Im gesamten Verlauf zeigten sich Ähnlichkeiten der Transgenexpression bei den drei Gruppen. Bei den Tieren, bei denen die Expression von CTLA4Ig gemessen wurde, kam es nach 30 Tagen zu einem ersten Anstieg der Serumkonzentration. An Tag 90 post transplantationem konnte ein Spitzenwert von $7,73 \pm 1.95$ ng/ml (n=3-5) verzeichnet werden. Diese Serumkonzentrationen blieben auch bis zum Tag 200 bestehen. (Abbildung 7)

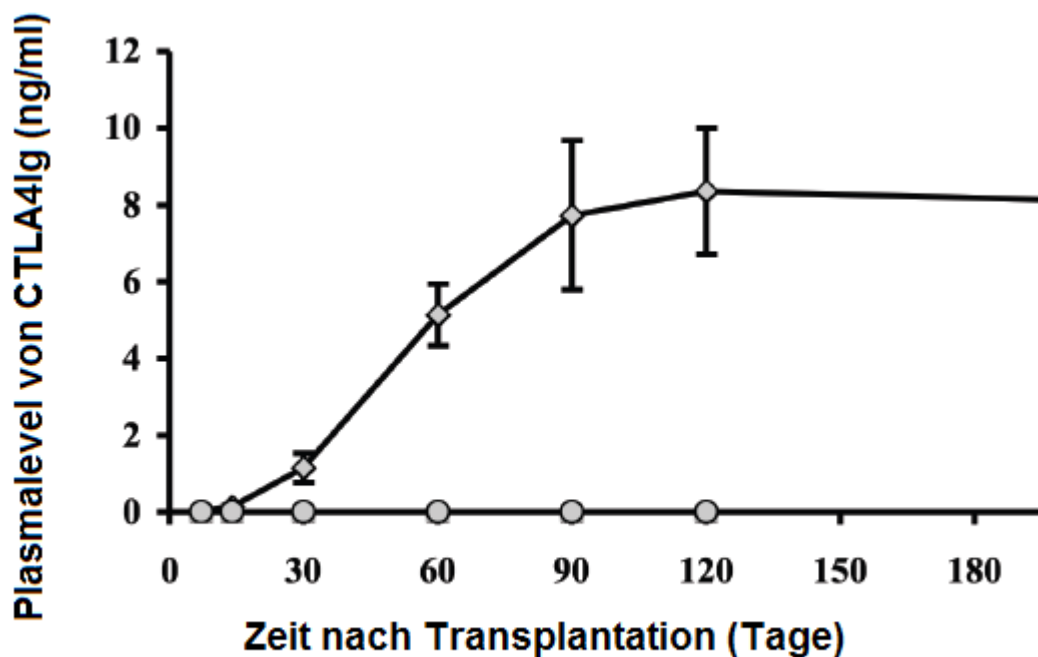


Abbildung7: Konzentrationsanstieg von CTLA4Ig aus dem Empfängerserum, Messung mittels ELISA-Verfahren.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Messungen der IL-10 Expression. Auch hier kam es am Tag 30 nach Transplantation zu einem Anstieg der Serumwerte. Nach dem Erreichen eines Maximums von $98,34 \pm 16,5$ pg/ml ($n=3-5$) an Tag 120 kam es im Folgenden zu einer Plateaubildung. Ebenso wie bei CTLA4Ig blieben diese erhöhten Werte bis zum Tag 200 bestehen (Abbildung 8).

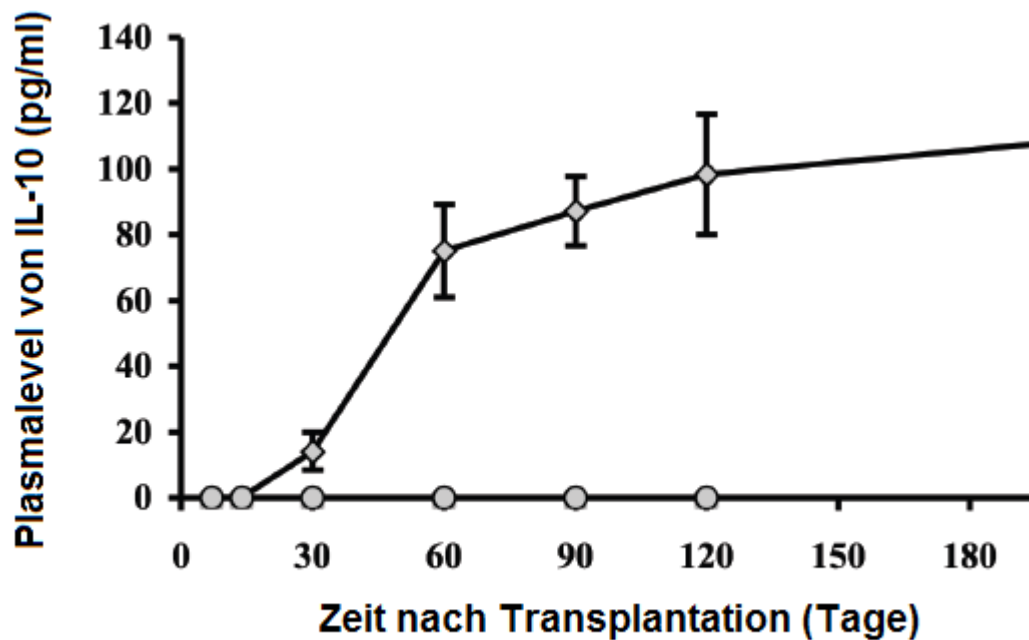


Abbildung8: Konzentrationsanstieg von IL-1 aus dem Empfängerserum, Messung mittels ELISA. ($n=3-5$).

3.4 Effekt von IDO

Die Indoleamin 2-3-Dioxygenase ist ein enzymatisches Protein, welches den Abbau von Tryptophan bewirkt. Es wird überwiegend in der Plazenta produziert und spielt während der Schwangerschaft eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der mütterlichen T-Zell-Aktivität (35). Hierdurch wird der Fetus über einen bisher ungeklärten Mechanismus vor einer Abstoßung durch den mütterlichen Organismus bewahrt. Dieses Enzym kann außerdem von anderen primären sowie sekundären Lymphorganen produziert werden (36).

In den hier dargestellten Versuchen kam es durch die Einschleusung von IDO mit Hilfe von AAV als Vektor zu keinem positiven Effekt auf das Organüberleben nach Transplantation. Das Überleben der allogenen Organe in diesem Modell konnte hierdurch nicht signifikant verlängert werden. Stattdessen wurden die Herztransplantate schon kurze Zeit nach der Operation vom Empfängertier abgestoßen. Die mittlere Überlebenszeit bis zur Abstoßung betrug in diesem Fall nur 19 Tage. (n=6) (Tabelle1)

Behandlung	Anzahl	Organüberleben (Tage)	Mittleres Überleben (Tage)	Langzeit- überleben (%)
Keine	6	17,20,21x2,22,32	21	0
AAV	6	19x3,20,22x2	19,5	0
AAV/IDO	6	19x4,20,21	19	0
AAV/CTLA4Ig	6	19,23x3,27,32	23	0
AAV/IL-10	6	20,21,24,34,35,47	29	0
CsA	9	27,28,43x2,53,>200x 4	53	44,4
CsA+AAV	7	29,30,37,48,>200x3	48	42,8
CsA+AAV/IDO	6	15,15,18,22,23,61	20*	0
CsA+AAV/CTL A4Ig	9	25,27,28,31,41,>200x 4	41	44,4
CsA+AAV/IL- 10	6	18,>200x5	>200*	83,3

*p<0,05 versus CsA, CsA+AAV

Tabelle1: Übersicht über die Dauer des Organüberlebens in den unterschiedlichen Gruppen, sowie die mittlere Überlebenszeit und das Langzeitüberleben.

Auch die zusätzliche Substitution von Cyclosporin A konnte das Überleben der AAV/IDO Gruppe nicht signifikant beeinflussen. Hier betrug die mittlere Überlebenszeit ebenfalls nicht mehr als 20 Tage (n=6). Im Vergleich dazu zeigten die Gruppen, welche nur Cyclosporin A (n=9) oder Cyclosporin A +AAV ohne Transgen (n=7) appliziert bekamen deutlich längere mittlere Überlebenszeiten von 53 und 48 Tagen.

Bei keinem der mit AAV/IDO behandelten Organe konnte ein Langzeitüberleben von mehr als 200 Tagen festgestellt werden. In den Kontrollgruppen, die nur mit Cyclosporin A behandelt wurden, wurde hingegen bei ca. 44% ein Langzeitüberleben erreicht.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Expression von IDO in den Parenchymzellen des Herzens das Langzeitüberleben der Transplantate nicht auf positive Weise beeinflussen kann.

3.5 Keine signifikante Besserung durch CTLA4Ig

CTLA4Ig ist ebenfalls stark immunmodulatorisch. Es hemmt die Immunantwort, indem es kostimulierende Signale des T-Zell-Systems ausschaltet. Exprimiert wird es nur von aktivierten zytotoxischen T-Zellen und wirkt dort unter anderem als negativer Regulator. Durch eine starke Bindung an das B7-Molekül auf Antigen-präsentierenden Zellen kommt es zu einer Hemmung des kostimulierenden Signalweges. Gegenstand der Untersuchungen war, durch die Ausschaltung der Immunantwort mittels CTLA4Ig ein verbessertes Langzeitüberleben nach Transplantation zu erreichen (42).

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, konnte mittels AAV-assoziierten Gentransfers eine ausreichende und für mindestens 200 Tage andauernde Expression von CTLA4Ig in den transplantierten Herzen erreicht werden. Trotz dieser guten Voraussetzungen konnten keine überlebensverlängernden Effekte auf die Organe beobachtet werden. Ähnlich wie bei der mit Indoleamin 2,3-Dioxygenase behandelten Gruppe betrug die mittlere Überlebenszeit nur 23 Tage (n=6). Es zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollgruppen auch hier keine Verbesserung des Langzeitüberlebens.

Obwohl die zusätzliche Substitution von Cyclosporin A das Organüberleben positiv beeinflussen konnte, wiesen die Gruppen mit alleiniger Gabe von Cyclosporin A oder Cyclosporin A +AAV eine längere mittlere Überlebenszeit von 53 bzw. 48 Tagen auf.

Insgesamt wird deutlich, dass durch den Versuch einer Unterdrückung der Immunantwort mit Hilfe von CTLA4Ig die Abstoßungsreaktion nach Transplantation nicht verhindert werden konnte.

3.6 Verbesserung des Langzeitüberlebens durch IL-10

Es wurde die Wirkung von IL-10 auf das Transplantatüberleben untersucht. Das Prinzip besteht darin, die akute Abstoßung durch dessen immunmodulatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften zu verhindern. Die Hemmung der Immunreaktion erfolgt auf molekularer Ebene über eine indirekte Hemmung Antigen-präsentierender Zellen (APC), von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (39). Dabei werden Proliferation, Differenzierung sowie die Bildung und Aktivität von Zytokinen und Chemokinen durch IL-10 reguliert (36).

Eine Einschleusung von IL-10 über AAV in die Zellen der allogenen Transplantate führte alleine schon zu einer geringen Verbesserung des Transplantat-Outcomes. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen mit einer mittleren Überlebenszeit von 21 Tagen (n=6), konnte bei den mit IL-10 behandelten Gruppen eine Steigerung der Überlebenszeit auf 29 Tage (n=6) verzeichnet werden.

Noch bessere Ergebnisse zeigten sich bei zusätzlicher Gabe von Cyclosporin A. In der Kombination von AAV/IL-10 und Cyclosporin A zeigten die Organe über 200 Tage keine Abstoßungsreaktion (n=6, $p < 0,01$). Bei der Kontrollgruppe mit alleiniger Gabe von Cyclosporin A blieb das mittlere Überleben auf 53 Tage beschränkt (n=9).

Der Anteil der Organe, die ein Langzeitüberleben zeigten, konnte durch IL-10 signifikant erhöht werden. Bei alleiniger Gabe von AAV/CTLA4Ig wurde nur bei

44,4% der transplantierten Organe ein Langzeitüberleben von mehr als 200 Tagen verzeichnet. Wohingegen in der Gruppe der mit AAV/IL-10 behandelten Herzen 83,3% länger als 200 Tage ohne akute Abstoßungsreaktion blieben.

Die Ergebnisse zeigen, dass Interleukin-10 hinsichtlich des Transplantatüberlebens sowohl der Indoleamin 2,3- Dioxygenase, als auch dem CTLA4Ig deutlich überlegen ist.

3.7 Histomorphologische Untersuchungen

Um die Auswirkungen der Gentherapie mit oben genannten Targetgenen weiter zu ergründen, wurden die transplantierten Herzen auch histomorphologisch untersucht. Es sollte beurteilt werden, in welchem Ausmaß unter gentherapeutischer Behandlung histomorphologische Veränderungen auftreten, die mit einer Verschlechterung des Transplantatoutcomes einhergehen.

Es wurden hierzu die mit AAV/CTLA4Ig und die mit AAV/IL-10 behandelte Organe miteinander verglichen, die jeweils eine Verbesserung des Langzeitüberlebens zeigten. Die histomorphologische Untersuchung wurde am Tag 200 nach Transplantation durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden insbesondere arteriosklerotische Veränderungen der Gewebe beurteilt. Zudem wurde das Vorhandensein zellulärer T-Zellinfiltrate als Ausdruck der entzündlichen Veränderungen untersucht. Des Weiteren erfolgte eine Messung von anti-Donor-Antikörpern aus den Seren der Empfängertiere mittels ELISA. Für die Beurteilung der Organvaskulopathie wurden eine Verhoeff'sche Elastinfärbung sowie eine Aktinfärbung der glatten Muskelzellen durchgeführt.

Die mit AAV/CTLA4Ig behandelten Organe zeigten nur geringe zelluläre Infiltrate von T-Zellen und Makrophagen (Abbildung 9). Im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit CsA bzw. CsA+AAV konnten sowohl bei den mit AAV/CTLA4Ig, als auch bei den mit AAV/IL-10 transduzierten Gruppen signifikant weniger Anti-Donor-Antikörper im Serum der Empfänger nachgewiesen werden (Abbildung 10). Sämtliche durchgeführte Färbungen zeigten unterschiedliche Grade der Arteriosklerose (Abbildung 9). In der Gruppe der mit AAV/IL-10 transduzierten Organe wurden vergleichsweise nur minimale arteriosklerotische Veränderungen gefunden. Bezüglich der Schwere der Arteriosklerose zeigten sich signifikante Unterschiede, wobei sich bei der Gruppe der mit AAV/IL-10 behandelten Organe im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich weniger Anzeichen der Sklerosierung zeigten (Abbildung 11).

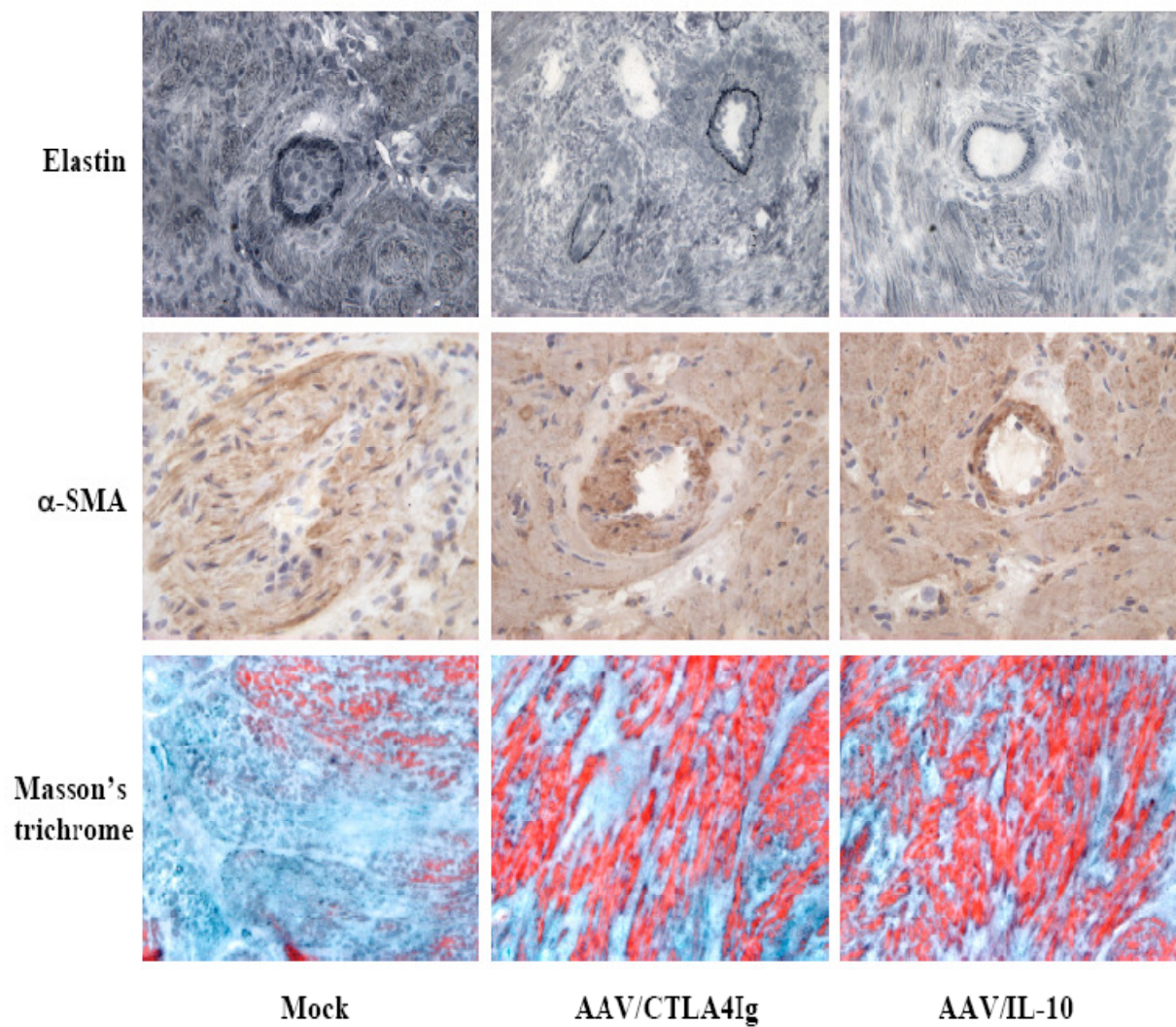


Abbildung9: Verhoeff's Elastinfärbung, SMA-Färbung (Smooth-Muscle-Actine) und Masson's Trichromfärbung bei Herztransplantaten am Tag 200 nach Transplantation zum Nachweis von AAV/CTLA4Ig und AAV/IL-10. (Auswahl repräsentativer Beispiele)

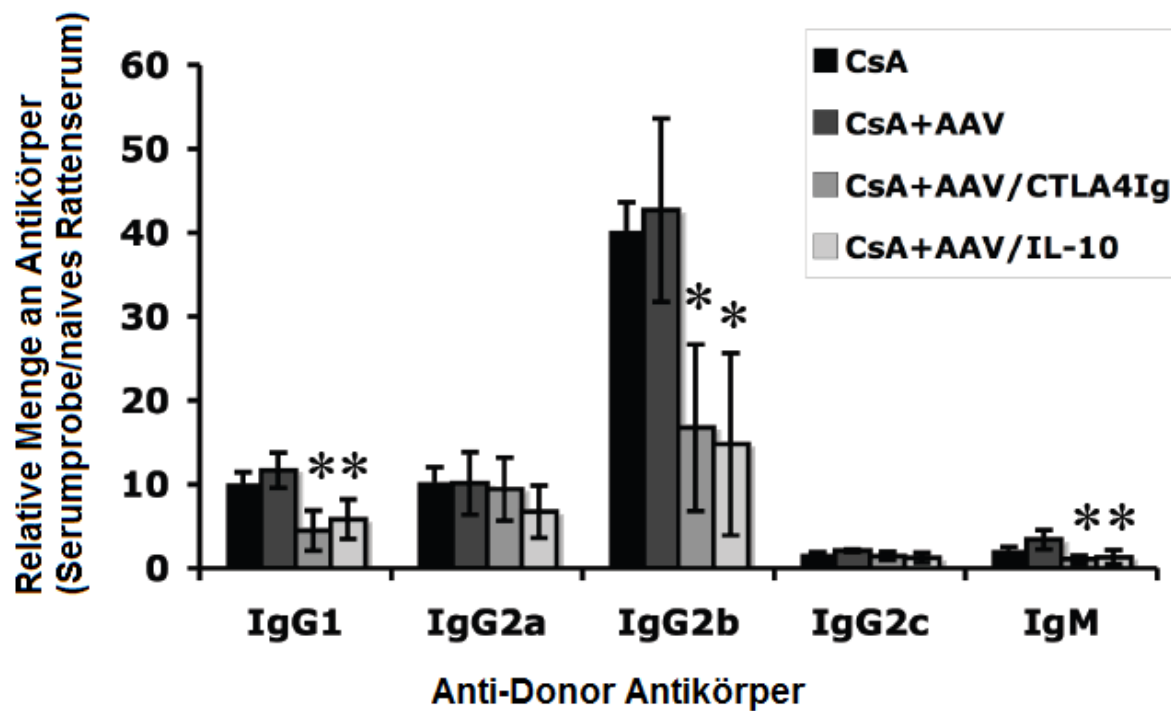


Abbildung10: Die Konzentrationen der Anti-Donor-Antikörper im Serum wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. signifikant niedrigere Werte bei CsA+AAV/CTLA4Ig und CsA+AAV/IL-10 ($n=5$, $*p<0,01$ gegenüber CsA oder CsA+AAV)

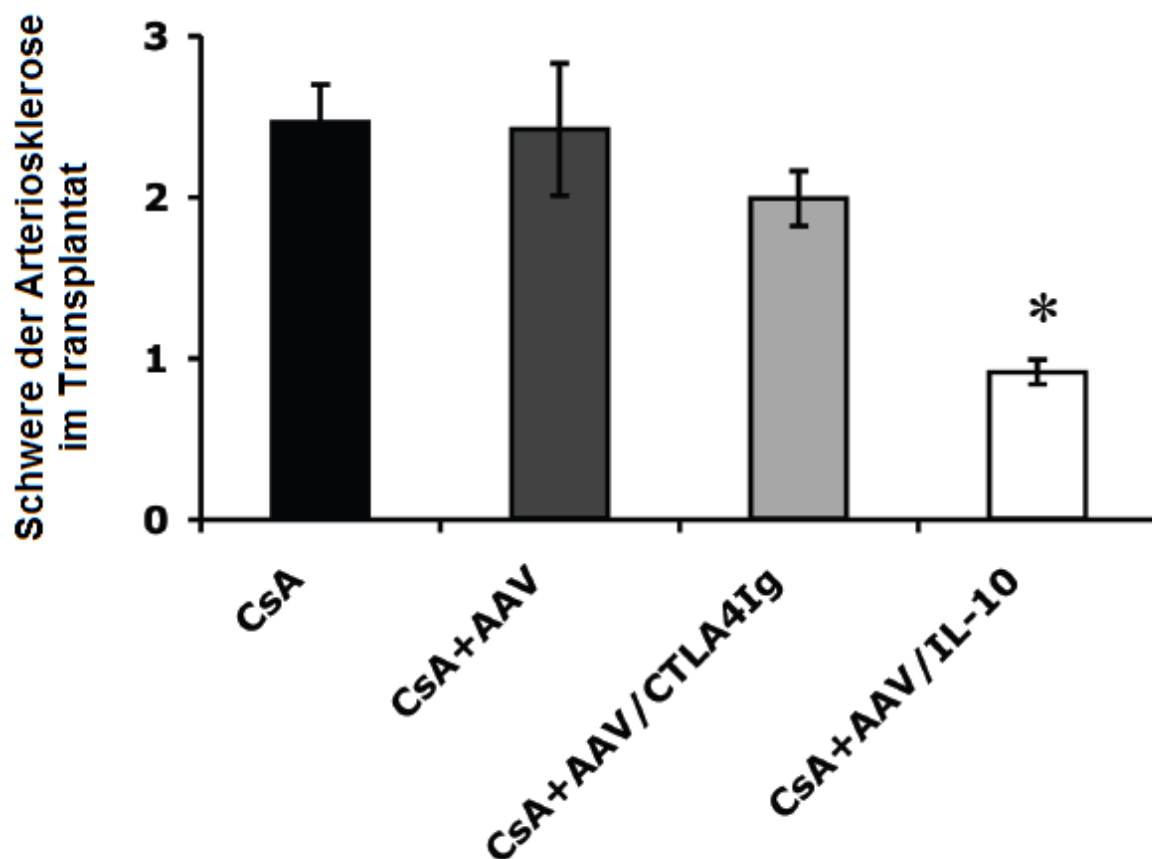


Abbildung 11: Grad der Arteriosklerose in den Transplantaten am Tag 200. Verglichen mit allen anderen Gruppen war die Arteriosklerose in den mit AAV/IL-10 behandelten Organen signifikant weniger stark ausgeprägt. ($n=3-5$, mittel \pm s.e.m), $*p < 0,01$ gegenüber CsA, CsA+AAV oder CsA+AAV/CTLA4Ig.

Die Schweregrade der histomorphologischen Veränderungen innerhalb der untersuchten Gruppen korrelieren mit den Überlebenszeiten und bestätigen zusätzlich die Annahme, dass IL-10 im Gegensatz zu CTLA4Ig die Entstehung der Organarteriosklerose verringert.

3.8 TGF- β 1 und MIF

Um den genauen Mechanismus aufzudecken, der zur Verhinderung der Arteriosklerose durch Behandlung mit IL-10 führt, wurde die Genexpression derjenigen Organe näher untersucht, die bis zum Tag 200 nach Transplantation ohne Abstoßung blieben. Hierzu wurden sowohl quantitative real-time PCR als auch „RNase protection assays“ verwendet. Die Analysen ergaben, dass in den mit IL-10 behandelten Organen geringere Level an „Transforming Growth Factor beta-1“ (TGF- β 1) und „Macrophage Migration Inhibitory Factor“ (MIF) zu finden waren. Sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den mit CTLA4Ig behandelten Organen waren die Konzentrationen signifikant höher (Abbildung 12 und 13).

Beides sind Zytokine, die zu einer Aktivierung der zellulären Immunantwort führen und somit eine Abstoßungsreaktion begünstigen. MIF wird sowohl in der Hypophyse, als auch von den meisten immunologischen Zellen gebildet. Es ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches über eine Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen zu einer Immunreaktion führt (43).

Der Transforming Growth Factor β spielt eine Rolle bei der Entstehung von Organfibrosierungen.

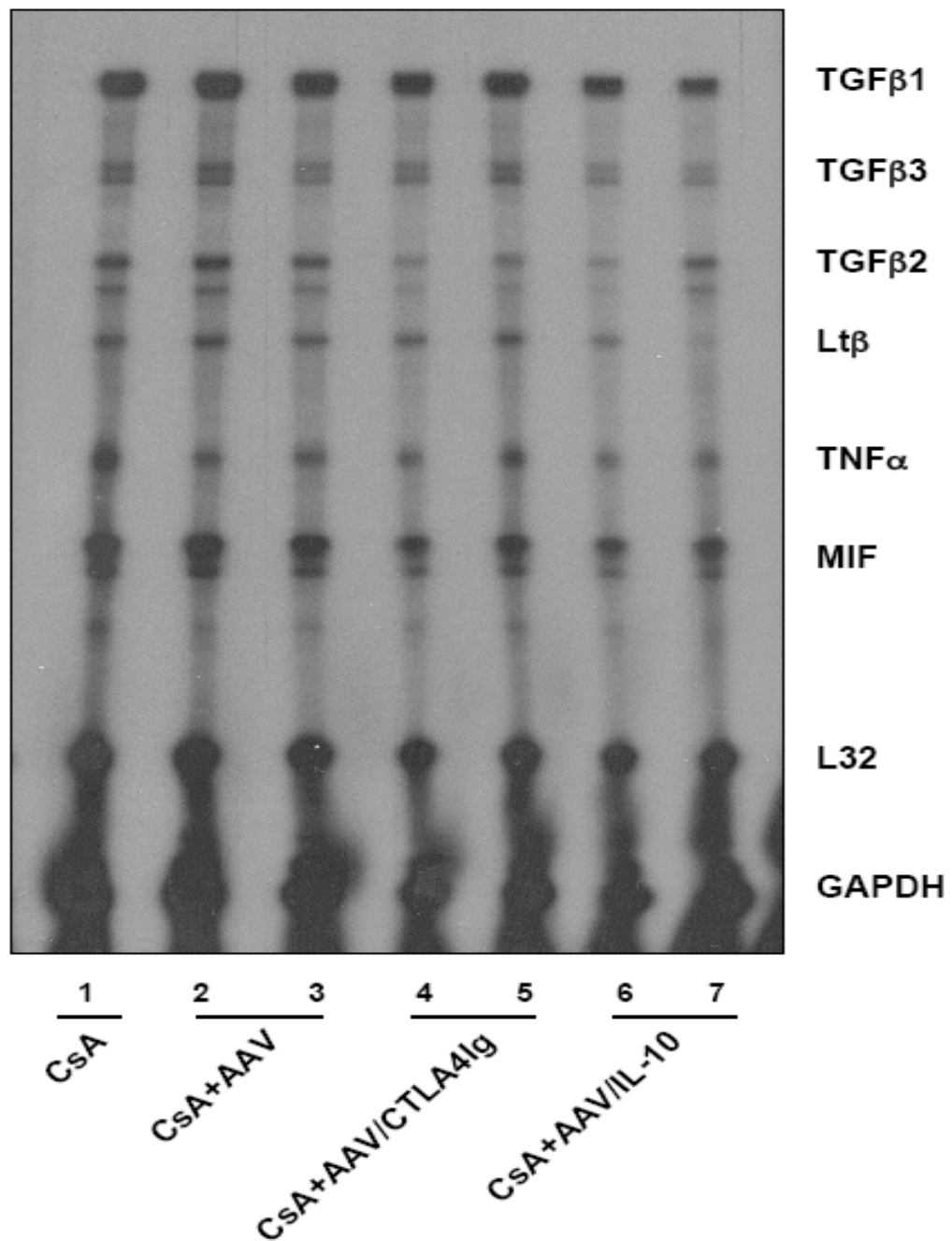


Abbildung12: Vergleich der Transskript-Level unterschiedlicher Behandlungsgruppen mit RNase protection assay. Geringere Expression von TGFβ1 und MIF bei CsA+AAV/IL-10

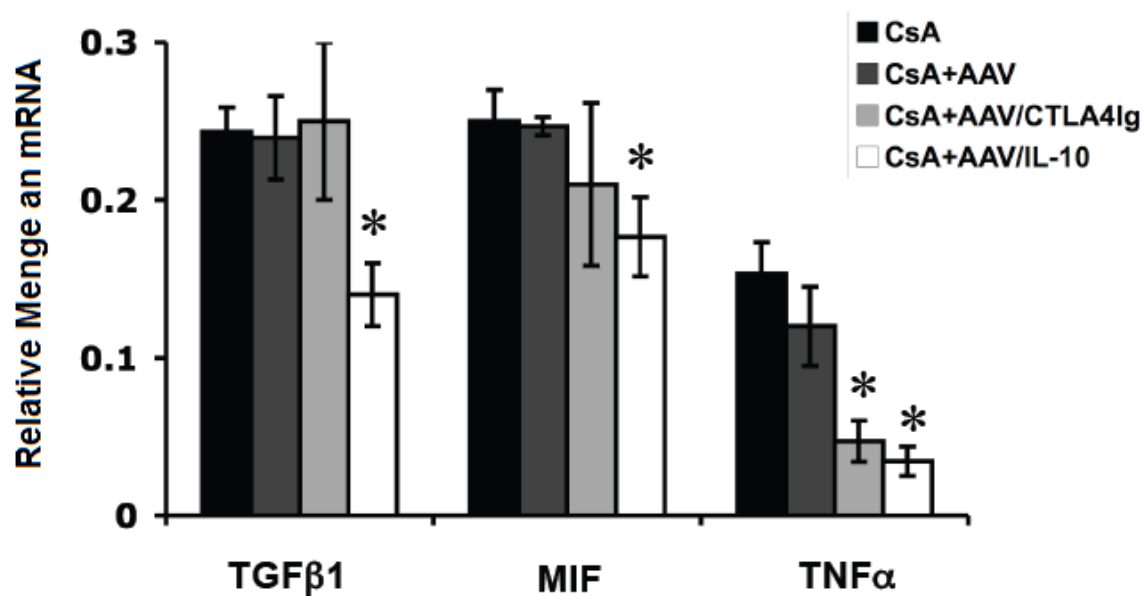


Abbildung13: In den mit AAV/IL-10 transduzierten Gruppen sind die Transskriptlevel von TGF-β1 und MIF am Tag 200 signifikant geringer als in den Kontrollgruppen;
 * $p < 0,05$ gegenüber CsA, CsA+AAV und CsA+AAV/CTLA4Ig

Zudem zeigten die Messungen der Hämoxygenase-1 (HO-1), einem zytoprotektiv wirkenden Enzym, signifikant höhere Level bei der AAV/IL-10 Gruppe im Vergleich zu allen anderen Testgruppen (Abbildung 14).

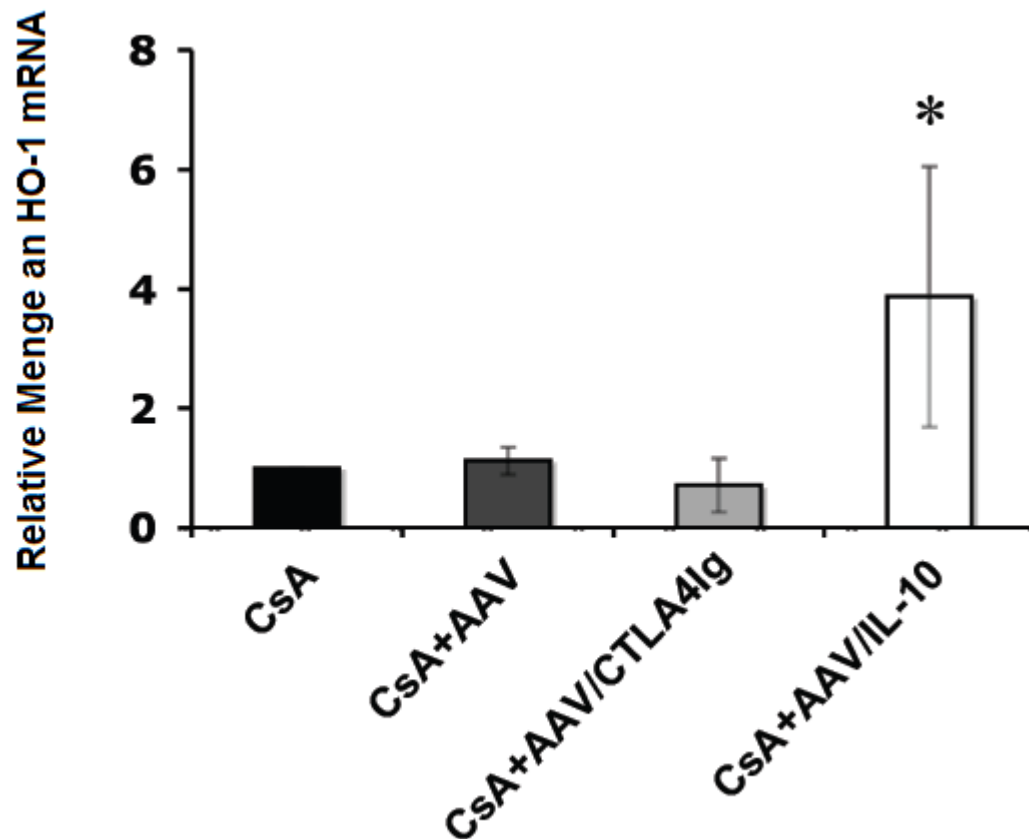


Abbildung14:Quantifizierung der Transskript-Level von HO-1 mittels rt-PCR: Die Level in der Gruppe CsA+AAV/IL-10 am Tag 200 nach Transplantation sind signifikant höher als in allen Kontrollgruppen; (mean \pm s.e.m.; n=3-5;*p<0,01 gegenüber CsA, CsA+AAV, CsA+AAV/CTLA4Ig)

4. Diskussion

Obwohl die Behandlungsstrategien zur Organtransplantation in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt wurden, können sich im Rahmen der Therapie schwerwiegenden Komplikationen ergeben, die zum Verlust des Organs führen können. Hieran sind chronische Abstoßungsprozesse durch das körpereigene Immunsystem beteiligt, die sich therapeutisch nur schwer beeinflussen lassen. Voraussetzung für die Erhaltung des transplantierten Spenderorgans ist in der Regel eine lebenslange Immunsuppression, die ihrerseits erhebliche Nebenwirkungen aufweist und auch zu einer Verminderung der Lebensqualität der Patienten führt. Eine Reduktion dieser immunsuppressiven Medikation kann einerseits unerwünschte Nebenwirkungen verringert, andererseits aber auch eine akute oder chronische Abstoßungsreaktion begünstigen.

Ein Hauptmerkmal der chronischen Abstoßungsreaktion ist die Transplantatvaskulopathie („allograft vasculopathy“), bei der es zur Proliferation bzw. zu Umbauvorgängen der Gefäßintima kommt. Die hieraus resultierenden Stenosen können zu Ischämien und Infarkten der betroffenen Organe führen. Ohne ausreichende Behandlung findet sich bei 30-40% der Patienten nach 5 Jahren eine signifikante Vaskulopathie mit Stenosierungen bis zu 50% des Gefäßlumens (44). Da transplantierte Patienten keine typischen pektanginösen Beschwerden zeigen, manifestiert sich die Abstoßungsreaktion erst spät in Form von Arrhythmien, Herzinsuffizienz oder gar dem plötzlichen Herztod (1).

Ein Ansatz zur Verhinderung akuter und chronischer Abstoßungsprozesse besteht in der gentherapeutischen Behandlung der Transplantate während der Phase der „kalten Präservation“ zwischen Explantation und Reimplantation. Auf diese Weise ließen sich durch eine Behandlung noch vor Implantation des Organs, also ex vivo,

zytoprotektive Gene injizieren, die zum Schutz des Gewebes vor Schädigung durch Ischämie und anschließender Reperfusion beitragen sollen. Gerade durch eine Schädigung zu diesem Zeitpunkt wird erwiesenermaßen eine spätere Abstoßung begünstigt. Es besteht außerdem die Möglichkeit mit Hilfe bestimmter organspezifischer Vektoren eine nur lokal wirksame Immunsuppression durchzuführen, um die unerwünschten Nebenwirkungen der systemischen Behandlung zu reduzieren und damit die Lebensqualität zu verbessern. Für eine erfolgreiche Gentherapie ist eine stabile und ausreichend hohe Genexpression der notwendigen Proteine Grundvoraussetzung, da es ansonsten zu einem frühzeitigen Abbruch der lebenswichtigen Therapie kommt.

Als ein geeigneter Vektor für eine derartige Genübertragung hat sich das rekombinante Adeno-assoziierte Virus erwiesen, da es aufgrund seiner unterschiedlichen Subtypen eine hohe Gewebsspezifität besitzt (46), eine große Aufnahmekapazität für Genmaterial hat und keine bekannten pathologischen Aktivitäten aufweist. Auf diesem Wege kann eine sichere, stabile und dabei effiziente Genexpression erreicht werden. Es kann eine ausreichend hohe immunsuppressive Wirkung auch über längere Zeit aufrechterhalten werden und das betroffene Organ dauerhaft und effektiv vor einer schwerwiegenden Abstoßungsreaktion bewahrt werden.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung ex vivo mittels Gentransfer ausreichend ist, um eine stabile Expression der erwünschten Targetgene auch über einen langen Zeitraum zu gewährleisten (3, 45).

In der hier beschriebenen Studie wurde untersucht, ob sich durch das Einschleusen bestimmter Gene mittels gentherapeutischer Maßnahmen positive Auswirkungen auf das Langzeitüberleben von Organtransplantaten erreichen lassen. Hierzu wurden

drei Gene untersucht, die auf unterschiedliche Weise immunmodulatorisch bzw. zytoprotektiv wirksam sind und dadurch einer chronischen Abstoßungsreaktion entgegen wirken könnten.

Die Indoleamin-2,3-Dioxygenase ist ein enzymatisches Protein, welches den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan bewirkt. Durch Degradation kommt es zur Bildung von Metaboliten, die über eine weitere Verstoffwechselung zur Bildung der Endprodukte Picolinsäure und Quinolonsäure führen (34, 35). Die IDO ist während der Schwangerschaft von entscheidender Bedeutung, da sie eine Hemmung der Immunreaktion des mütterlichen Organismus gegenüber dem ungeborenen Fetus bewirkt. Sie wird sowohl während der Schwangerschaft in der Plazenta, als auch in unzähligen Zellen primärer und sekundärer Lymphorgane gebildet (34). Ihr Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig bekannt, jedoch wurden die immunmodulatorischen Eigenschaften bereits in einigen unterschiedlichen Studien untersucht und bestätigt (34, 36). Es wird angenommen, dass diese immunregulatorischen Effekte der IDO aus einem Mangel an Tryptophan als essentielle Aminosäure und einem Übermaß an Kynurenin und seinen Metaboliten hervorgerufen werden (47). Auch andere Proteine, die das Immunsystem beeinflussen können, wirken über eine Erhöhung der IDO-Aktivität (47, 48). Hintergrund der Studie war unter anderem zu untersuchen, ob mit Hilfe der immunmodulatorischen Eigenschaften des Enzyms im Rahmen der Transplantation ein körperfremdes Organ vor einer überschießenden Immunreaktion des Empfängers bewahrt werden kann. Dieser Effekt würde hauptsächlich durch eine Downregulation der T-Zellaktivität zustande kommen, die durch die Expression von IDO initiiert wird.

In unserem Modellversuch der Herztransplantation konnten trotz ausreichender und langanhaltender Expression von IDO nach Transfektion mit AAV das Organüberleben nach Transplantation nicht positiv beeinflusst werden.

Da die IDO ein enzymatisch wirkendes Protein ist, könnte die zelluläre Umgebung eine entscheidende Rolle für den Erfolg bzw. Misserfolg der Behandlung spielen. Die IDO reguliert die T-Zellaktivität unter anderem durch die Katalysation von Tryptophan und in gewisser Weise auch durch deren Metaboliten. Möglicherweise verursacht der Einsatz des Enzyms ein zelluläres Ungleichgewicht an dieser essentiellen Aminosäure, welches die Überlebenszeit des betroffenen Gewebes entscheidend beeinflusst. Anstatt einer Transfektion des Enzyms IDO wäre die Applikation einer Mischung von Tryptophan-Metaboliten zur Verlängerung des Transplantatüberlebens vorstellbar. Positive Effekte diesbezüglich konnten in Tierversuchen bereits beobachtet werden (35).

Desweiteren wurde CTLA4Ig bzw. dessen Effekt auf die Überlebensdauer von Organtransplantaten getestet.

Zur Aktivierung von T-Zellen werden prinzipiell zwei Signalwege benötigt. Zunächst erfolgt eine Stimulierung des T-Zellrezeptors durch MHC-präsentierende Zellen. Diese Aktivierung alleine hat noch keine Immunreaktion zur Folge. Es ist ein zusätzlicher kostimulierender Signalweg nötig um eine regelrechte Immunantwort zu erlangen. Dieser Signalweg wird z.B. durch eine Interaktion von CD28 auf T-Zellen und B7 auf Antigen-präsentierenden Zellen ausgelöst. Erst durch die Bindung dieser beiden Moleküle kommt es zur endgültigen Aktivierung der T-Zellantwort (49).

In diesen zweiten Signalweg greift CTLA4Ig ein. Dieses Fusionsprotein wird ausschließlich auf aktivierten zytotoxischen T-Zellen (CTL) gebildet und wirkt als kompetitiver Inhibitor. CTLA4Ig ist CD28 morphologisch sehr ähnlich und besitzt

zudem eine mehrfach stärkere Affinität für B7. Durch eine Bindung von CTLA4Ig mit dem B7-Molekül auf Antigen-präsentierenden Zellen wird der für die Immunreaktion wichtige kostimulierenden Signalweg blockiert und somit der T-Zellaktivierung entgegengewirkt (42, 50).

In einigen Studien konnte die Hemmung der T-Zellaktivität durch CTLA4Ig gezeigt werden (51). Analog dazu wurde eine signifikante Verlängerung des Organüberlebens durch die Behandlung von Lebertransplantaten mit CTLA4Ig mit Hilfe von AAV im Tierversuch beobachtet (45). Als Voraussetzung hierfür wurde ein ausreichend hoher Level der Proteinexpression angesehen. Zusätzlichen Schutz vor einer akuten Abstoßungsreaktion könnte eine Kombinationstherapie mit einer niedrig dosierten medikamentösen Immunsuppression bringen. In einer Studie führte eine solche Kombinationstherapie verglichen mit Kontrollgruppen zu einer geringeren zellulären Infiltration der Gewebe mit immunologisch wirksamen Zellen (45).

In unserem Herztransplantations-Modell erzielte der Einsatz von CTLA4Ig keine Verlängerung des Langzeitüberlebens. Trotz ausreichend hoher Expression von CTLA4Ig konnte einer chronischen Abstoßungsreaktion nicht entgegengewirkt werden. Die Überlebensrate der transplantierten Organe konnte nicht signifikant verbessert werden.

Auch die Entstehung der Arteriosklerose in den transplantierten Organen, die eine chronische Abstoßung begünstigt wurde durch CTLA4Ig nicht reduziert. Die Histomorphologie der Organpräparate zeigte zudem eine deutliche Einwanderung von Makrophagen. Möglicherweise wurde dies durch die im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich erhöhte Konzentration an Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) ausgelöst. MIF ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches durch eine Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem stimuliert (43). Eine wichtige Rolle spielt der MIF bei

Erkrankungen, die mit einer überschießenden Immunreaktion einhergehen, wie z.B. ARDS, Asthma oder Sepsis (52, 53). Es konnte auch gezeigt werden, dass über eine Hochregulierung von MIF im Rahmen von akuten Abstoßungsreaktionen eine vermehrte Einwanderung von Immunzellen in die betroffenen Organe ausgelöst wurde. Man beobachtete dabei eine Korrelation von Ausprägung der Abstoßungssymptome und der Konzentration von MIF (54).

In gleichem Maße zeigten sich außerdem erhöhte Werte von TGF β -1 (Transforming Growth Factor 1), welches mit fibrotischen Umbauvorgängen in Verbindung gebracht wird. Möglicherweise werden Prozesse, die zur kardialen Vaskulopathie nach Herztransplantation führen, durch eine erhöhte Expression dieses Zytokins begünstigt. Der genaue Mechanismus hierfür ist nicht vollständig geklärt, aber man geht davon aus, dass unter anderem eine Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur sowie eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix ursächlich sind (55, 56).

Zuletzt wurde der Effekt einer Behandlung mit IL-10 untersucht. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und hat eine entscheidende Funktion bei der Unterdrückung überschießender Immunreaktionen über eine Regulierung der T-Zellaktivität. Es wird unter anderem die Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen, wie z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8 oder auch TNF α gehemmt. Auch die Ausprägung von MHC II-Molekülen sowie anderer Kostimulatoren auf Antigen-präsentierenden Zellen wird durch IL-10 beeinflusst (57).

Wie bei den beiden Vorversuchen konnte eine andauernde und ausreichend hohe Genexpression von IL-10 erreicht werden. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Gruppen kam es in den mit IL-10 behandelten Gruppen zu einer signifikanten Verlängerung des Organüberlebens.

Im Vergleich zu den mit CTLA4Ig transduzierten Organen wurde eine deutlich geringere Entwicklung von Organarteriosklerose festgestellt. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein von IL-10 entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion hat.

Positive Auswirkungen diesbezüglich hatten vermutlich die verminderten Transkriptionslevel von TGF β -1 sowie die erhöhten Level von HO-1 (Hämoxygenase 1). Beides hat eine hemmende Wirkung auf die Entstehung einer verstärkten Arteriosklerose in transplantierten Organen.

HO-1 ist ein Enzym, welches eine Degradation von Häm bewirkt und über unterschiedliche Mechanismen einen wirksamen Schutz gegenüber oxidativem Stress und dadurch resultierenden Schädigungen von Gefäßwänden bietet. Durch die Spaltung von Häm entstehen die Endprodukte Kohlenmonoxid, Biliverdin, sowie freies Eisen, die sich durch anti-oxidative Eigenschaften auszeichnen und dadurch die protektive Wirkung der Hämoxygenase 1 begründen (58).

Insgesamt konnte in den beschriebenen Testreihen dargelegt werden, dass eine gentherapeutische Behandlung von transplantierten Organen mit IL-10 im Versuchsmodell deutlich bessere Ergebnisse bringt als die gleiche Behandlung mit CTLA4Ig oder IDO. Obwohl alle drei Proteine nachweislich über eine immunmodulatorische Wirkung verfügen, konnte eine ausreichende Hemmung der Immunantwort zum Schutz vor einer akuten oder chronischen Transplantatabstoßung nur durch den Einsatz von IL-10 erreicht werden. Sowohl bei IDO, als auch bei CTLA4Ig konnte ein Verlust der transplantierten Organe nicht verhindert werden. Diese Tatsache lässt Rückschlüsse auf die Komplexität der chronischen Abstoßungsprozesse zu und macht deutlich, dass diese durch eine ungezielte Immunsuppression nicht wirkungsvoll verhindert werden kann. Um die Möglichkeit

und das Potential einer nachhaltigen und effektiven Erhaltungstherapie zu ergründen, sind sicherlich weitere Studien nötig.

Ein möglicher Ansatz diesbezüglich könnte in der kombinierten Anwendung von IL-10 und HO-1 liegen. Es liegen Erkenntnisse vor, die das positive Zusammenwirken von IL-10 und HO-1 insbesondere bei der Entstehung von Gefäßerkrankungen belegen (58, 59).

5. Zusammenfassung

Die Medizin verzeichnet auf dem Gebiet der Organtransplantation in den letzten Jahren deutliche Fortschritte. Dennoch stellt die chronische Abstoßungsreaktion trotz konsequent durchgeführter medikamentöser Immunsuppression nach wie vor eine schwerwiegende Komplikation dar, die nicht selten zum Verlust des transplantierten Organs führt. In der vorliegenden Arbeit wurden gentherapeutische Verfahren untersucht, um auf alternativem Wege eine Immunsuppression zu erreichen und diesem Prozess nachhaltig entgegen zu wirken. Um das Langzeitüberleben der Transplantate zu verbessern, sollten immunmodulatorische Gene mit Hilfe viraler Vektoren direkt in die entnommenen Organe eingeschleust werden. Als Vektor hierfür dienten Adeno-assoziierte Viren, die zu diesem Zweck in unterschiedlichen Studien bereits erfolgreich eingesetzt wurden. In den Versuchsreihen wurden insgesamt drei Zielgene (IDO, CTLA4Ig und IL-10) in die zu transplantierenden Organe eingeschleust und im Folgenden das Langzeitüberleben der Versuchstiere beobachtet. Alle drei zeigen über unterschiedliche Mechanismen eine immunmodulatorische Wirkung. In den Versuchsreihen wurden Herztransplantationen bei Ratten durchgeführt und die Zielgene ex vivo über virale Vektoren injiziert. Während bei IDO und CTLA4Ig keine positive Wirkung auf das Überleben festgestellt werden konnte, kam es bei Einschleusung von IL-10 in die Zellen der Herztransplantate zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit (Mittlere Überlebenszeit 29 Tage; in Kombination mit Cyclosporin A Langzeitüberleben bei 83% der Versuchstiere). Zudem zeigten diese Organe signifikant weniger arteriosklerotische Veränderungen. Der Einsatz von IL-10 bietet somit einen möglichen Ansatz zur Verbesserung des Transplantatüberlebens und

sollte zum Zweck eines besseren Outcomes in der Transplantationsmedizin weitere untersucht werden.

6. Abkürzungen

AAV	Adeno assoziierte Viren
AK	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
APC	Antigen präsentierende Zellen
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAV	Cardiac allograft vasculopathy ("Transplantatvaskulopathie")
CD	Cluster of differentiation
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CsA	Cyclosporin A
C _T	threshold cycle
CTLA4lg	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen
DAB	3,3- diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
FK506	Tacrolimus
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-phosphat-dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HO-1	Heme-Oxygenase-1
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HTK Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
IDO	Indoleamin2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove modified Dulbecco's medium
ITR	inverted terminal repeats
kb	kilobasen
LB-Broth	Luria Bertani Medium
M	1 molar

MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Macrophage inhibitory factor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	1 millimolar
μ l	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
Na_2PO_4	Natriumphosphat
ORF	open reading frames
P	Promotor
PBS	phosphate buffered saline
pg	Pikogramm
rAAV	rekombinante Adeno-assoziierte Viren
Rep	Replikationsproteine
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
RT-PCR	real-time Polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfat (Natriumdodecylsulfat)
TGF- β	Tumor growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
VP	Viruskapsid-Protein

7.Literaturverzeichnis

- 1 Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR, et al.
Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors.
J Heart Lung Transplant 1998; 17:744–53
- 2 Förstermann U
Erste Erfolge, viele noch unerfüllte Hoffnungen
Dtsch Ärzteblatt 2003; 100:314-318
- 3 Tsui TY et al;
Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus- mediated heme oxygenase-1 gene transfer
Circulation 2003; 107:2623-2629
- 4 Libby P, Pober JS
Chronic rejection
Immunity 2001; 14:387–397
- 5 Yet SF, Tian R, Layne MD et al.
Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice.
Cir Res 2001; 89:168–173
- 6 Alkalin E, Bromberg JS
Gene therapy and solid-organ transplantation;
Kidney international 2002; 6:S56-S60
- 7 Guillot C, le Mauff B
Gene therapy in transplantation in the year 2000: moving towards clinical applications?
Gene Ther. 2000; 7:14-19
- 8 Henry CM, Washington C
Gene delivery–without viruses
Cenear 2001; 79:35-41
- 9 Li S, Huang L
Nonviral gene therapy: promises and challenges
Gene Ther. 2000; 7:31-34
- 10 Manuel AFV, Goncalves
Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector
Virology Journal 2005; 2:43
- 11 Afione et al
In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue.
J Virol 1996; 70:3235-3241
- 12 Felgner P
Nonviral strategies for gene therapy
Scientific American 1998; 6:86

- 13 Wolff JA et al
Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*.
Science 1990; 247:1465-1468
- 14 Condon C et al
DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells
Nature Med 1996; 2:1122-1128
- 15 Yang NS et al
In vivo and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.
Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:9568-9572
- 16 Rols MP et al
In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma
Nat Biotechnol 1998; 16:168-171
- 17 Lundstrom K
Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials
Technol Cancer Res Treat 2003; 2:471-486
- 18 Check E
Gene Therapy: A tragic setback
Nature 2002; 420:116-118
- 19 Amado RG, Chen ISY
Lentiviral vectors—the promise of gene therapy within reach?
Science 1999; 285:674-676
- 20 Robbins Paul D
Viral vectors for gene therapy
TIBTECH 1998; 16:35-40
- 21 Wilson JM
Adenoviruses as gene-delivery vehicles
New Engl J Med 1996; 334:1185-1187
- 22 Haecker S.E. et al
In vivo expression of full-length human dystrophin from adenoviral vectors deleted of all viral genes
Hum Gen Ther 1996; 7:1907-1914
- 23 Archison RW, Castro BC, Hammon WM
Adenovirus-associated defective virus particles
Science 1965; 149:754-756
- 24 Flotte et al
Phase I trial of intranasal and endotracheal administration of a recombinant adeno-associated virus serotype (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study
Hum Gen Ther 2003; 14:1079-1088

- 25 Moss et al
Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial
Chest 2004; 125:509-521
- 26 Barrie J. Carter
Review: Adeno-associated virus vectors in clinical trials
Hum Gen Ther. 2005; 16:541-550
- 27 Monahan Paul E, Samulski RJ
Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? Molecular Medicine Today 2000; 6:433-440
- 28 http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAparvo.html; Stewart Mc Nulty at Veterinary Sciences, Queen's University, Belfast
- 29 Brüning H et al
Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy
CellsTissues Organs 2004; 177:139-150
- 30 Summerford C., Samulski RJ
Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions
J Virol. 1998; 72:1438-1445
- 31 Grimm D, Kay MA
From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy
Curr Gene Ther 2003; 3:281-304
- 32 Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, Berns KI
Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter
Genomics 1991; 10:831-834
- 33 Owens RA
Second generation adeno-associated virus type 2- based genetherapy systems with the potential for preferential intergration into AAVSI
Curr Gene Ther 2002; 2:145-159
- 34 Munn DH, Zouh K, Attwood IT et al
Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism
Science 1998; 281:1191
- 35 Bauer TM
Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-Dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo
Transplant International 2005; 18:95-100
- 36 Munn DH, Shafidazeh E, Attwood JT
Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism
J Exp Med 1999; 189:1363-1372

- 37 Linsley PS, Brady W, Urnes M
CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7
J Exp Med 1991; 174:561
- 38 Wu Y, Guo Y, Liu Y
A major costimulatory molecule on antigen-presenting cells, CTLA4 ligand A, is distinct from B7
J Exp Med 1993; 178:1789
- 39 Grütz G
New insights into the molecular mechanism of Interleukin-mediated immunosuppression
J Leukoc Biol 2005; 77:3-15
- 40 Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason
Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield
Gene Ther 1999; 6:973-985
- 41 Zolotukhin S, Potter M, Zolotukhin I
Production and purification of serotype 1, 2 and 5 adeno-associated viral vectors
Methods 2002; 28:158-167
- 42 Kita Yusuke, et al
Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4lg-Gene
Transplantation 1999; 68:758-766
- 43 Thierry C, Thierry R
Macrophage Migration Inhibitory Factor: a regulator of innate immunity.
Immunology 2003; 3:791-800
- 44 Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al.
Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twentyfourth official adult heart transplant report-2007
J Heart Lung Transplant 2007; 26:769–81
- 45 Yang Z.; Wu X., Tsui TY
Long-term liver allograft survival induced by combined treatment with rAAV–hCTLA4lg gene transfer and low-dose FK506
Tranplantation 2003; 75:303-308
- 46 Chooi M, Yvonne K.Y., Rakoczy E.
Adenovirus and Adeno–associated virus vectors
DNA and Cell Biology 2002; 21:895-913
- 47 Mulley WR, Nikolic-Paterson DJ
Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Transplantation
Nephrology 2008; 13:204-211
- 48 Schagen FHE, Rademaker HJ, Fallaux FJ
Insertion vectors for gene therapy
Gene Ther 2000; 7:271-272

- 49 Schwartz RH
Costimulation of T lymphocytes: the role of CD 28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy
Cell 1992; 71:1065
- 50 June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB
The B7 and CD28 receptor families
Immunol Today 1994; 15:321–331
- 51 Benigni A, Tomasoni S, Turka LA, et al.
Adeno-associated virus-mediated CTLA4lg gene transfer protects MHC-mismatched renal allografts from chronic rejection
J Am Soc Nephrol 2006; 17:1665
- 52 Lue H, Kleemann R
Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease
Microbes Infect 2002; 4:449–460
- 53 Yamaguchi E. *et al.*
Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bronchial asthma
Clin Exp Allergy 2000; 30:1244–1249
- 54 Brown *et al.*
Upregulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor in acute renal allograft rejection in the rat
Clin Exp Immunol 1999; 118:329–336
- 55 Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA.
Regulation of epithelial proliferation by TGF-beta
Ciba Foundation Symposium 1991; 157:66-74
- 56 Aziz et al.
Transforming growth factor β in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2000; 119:700-708
- 57 K Shinozaki, H Yahata, H Tanji, T Sakaguchi, H Ito and K Dohi
Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation
Gene Ther. 1999; 6:816–822
- 58 Toshisuke Morita
Heme Oxygenase and Atherosclerosis
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25:1786-1795
- 59 Tzong-Shuyan Lee, Lee-Young Chau
Heme Oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice
Nature Medicine 2002; 8:240-246

8.Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Tung-Yu Tsui, der mir die Arbeit an diesem Projekt ermöglicht hat. Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. med. Jian Ma bedanken, der mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Desweiteren danke ich Herrn Sebastian Frieling.

9. Lebenslauf

Cristina Kathrin Häring

Virchowstr.1

89075 Ulm

Tel.: +49(0)731 3788129

Geburtsdatum 19. August 1983

Geburtsort Neuburg an der Donau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

1989-1993 Grundschole Neuburg /Do.
1993-2002 Descartes-Gymnasium Neuburg /Do.,
2002 Abitur; Note 1,8

Hochschulausbildung

2002-2008 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
2004 Ärztliche Vorprüfung (Physikum), Gesamtnote "befriedigend"
2008 Staatsexamen Humanmedizin
12/2008 Erteilung der Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

08/2007-10/2007 Klinik für Hämatologie/Onkologie, Universität Regensburg,
10/2007-12/2007 „All India Institute of Medical Sciences“ (AIIMS), New Delhi, Indien
Department of Medicine I, Department of Gastroenterology,
Emergency Department
12/2007-04/2008 Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Unfallchirurgie und Gefäßchirurgie,
Universität Regensburg,
04/2008-07/2008 Klinik für Kinder- und Jugendmedizin , Klinik St. Hedwig, Regensburg

Berufliche Erfahrung

Seit März 2009 Assistenzärztin Medizinische Klinik I, Klinikum Heidenheim

Publikation

Targeting of interleukin-10 is superior to cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 with human immunoglobulin G(1) for the prevention of chronic allograft deterioration in organ transplantation.

Xu T, Häring C, Lau CK, Obed A, Ma J, Doenecke A, Scherer MN, Schnitzbauer AA, Fan ST, Schlitt HJ, Tsui TY:

Journal of Gene Medicine 2008; 10:1315-1323

